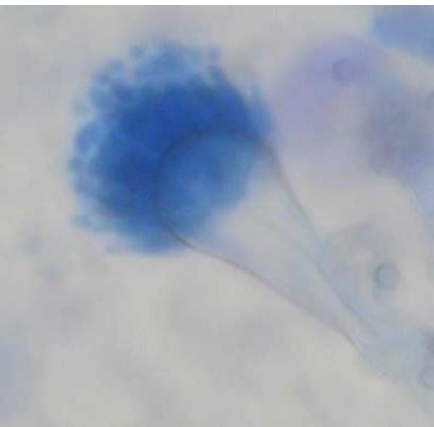


Αρχές διάγνωσης μυκητιασικών λοιμώξεων

Σαμπατάκου Ελένη

Αν. Καθηγήτρια Παθολογίας Λοιμώξεων



ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΕΣ ΜΥΚΗΤΙΑΣΕΙΣ

ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Ζυμομύκητες

- *Candida albicans*
- *Cryptococcus neoformans*

Υφομύκητες

- *Aspergillus sp.*
- *Zygomycetes*

- *Fusarium*
- *Scedosporium*

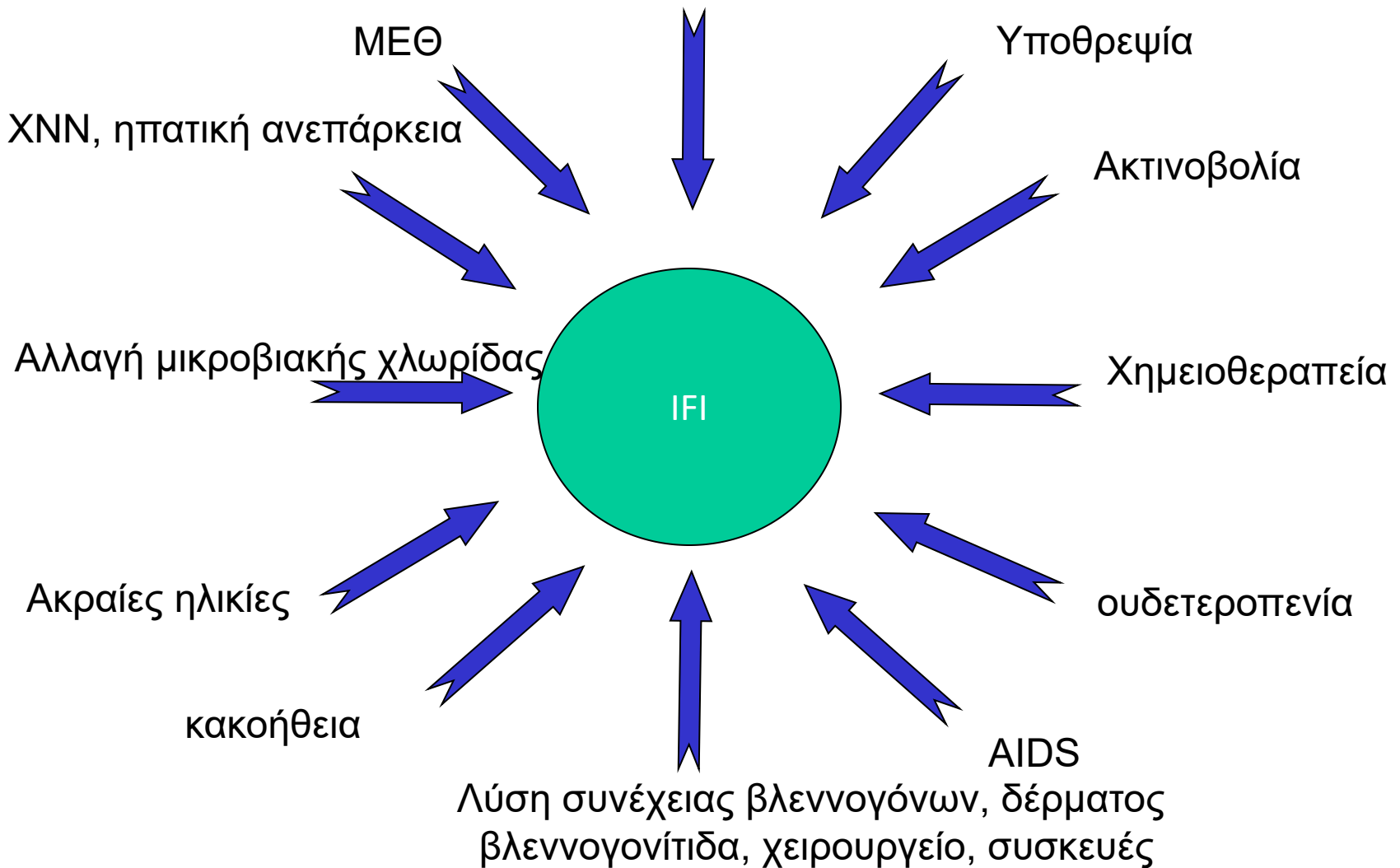
Ενδημικοί δίμορφοι

- *Histoplasma capsulatum*
- *Coccidioides immitis*
- *Blastomyces dermatitidis*
- *Paracoccidioides sp.*

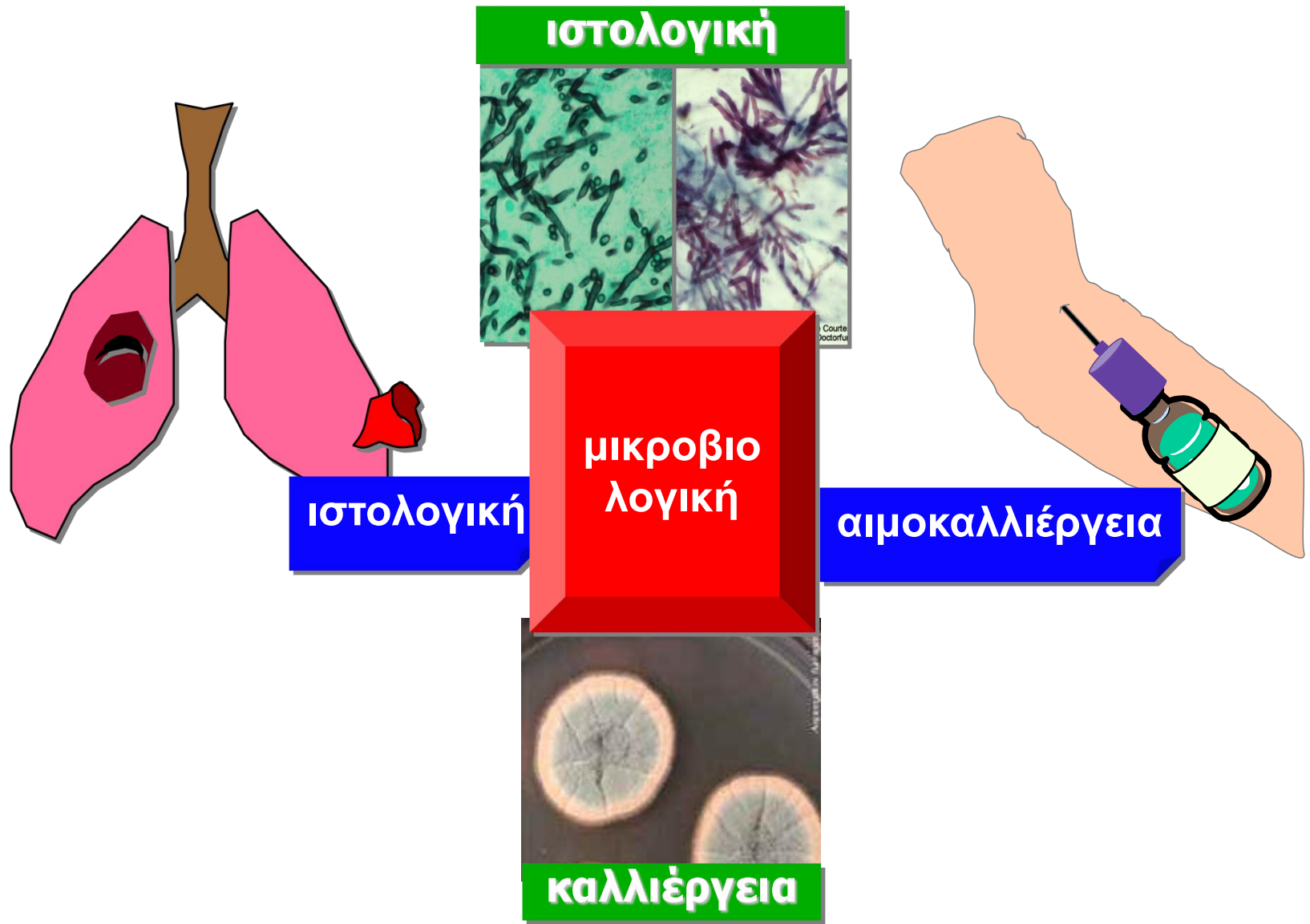
Προδιαθεσικοί παράγοντες για διηθητική μυκητίαση

Dimopoulos G, Vincent JL, 2002

Ανοσοκαταστολή, κυκλοσπορίνη, στεροειδή



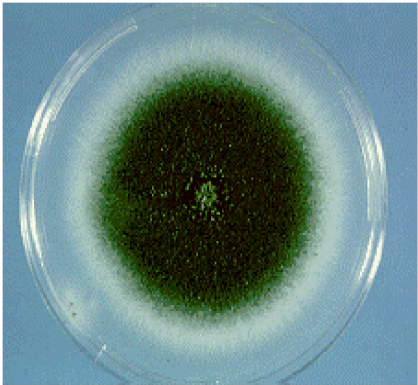
τεκμηριωμένη μυκητιασική λοίμωξη



Γιατί υπάρχει μικρή πρόοδος στη διάγνωση Συστηματικών μυκητιάσεων?



- ❑ Σημεία και συμπτώματα **μη ειδικά**
- ❑ Διηθητική νόσος δύσκολα διακρίνεται από **αποικισμό**



- ❑ Τα κλασσικά διαθέσιμα τεστ θετικοποιούνται αργά και χαρακτηρίζονται από **χαμηλή ευαισθησία και/ή ειδικότητα**

- ❑ Αδυναμία διενέργειας επεμβατικών διαγνωστικών



Εργαστηριακή διάγνωση

- Άμεση μικροσκόπηση
- Καλλιέργεια
- Ορολογικά tests
- Δερματικά tests
- PCR & άλλες μοριακές μέθοδοι

Τεστ αίματος για ασθενείς με εν τω βάθει και συστηματικές μυκητιακές λοιμώξεις

Τα τεστ αίματος δεν είναι χρήσιμες για την διάγνωση επιπολής λοιμώξεων. Σε υποδόριες και συστηματικές μυκητιάσεις διάφορα τεστ είναι επιβοηθητικά.

- **Καλλιέργειες**
- **Αντισώματα** (ιστοπλάσμωση, κοκκιδιοειδομύκωση)
- **Αντιγόνο** (κρυπτοκόκκωση, ασπεργίλλωση, καντιντίαση, ιστοπλάσμωση).

Συστηματικές μυκητιάσεις κλινικό δείγμα

- Πύον
- Βιοψία
- BAL
- Ούρα
- Πτύελα
- ΕΝΥ
- Αίμα
- Απόξεση ή swabs από τις βλάβες

Αποστειρωμένος συλλέκτης για συλλογή υλικού για καλλιέργεια μυκήτων



Συλλογή υλικού, μεταφορά και επεξεργασία

- **Επαρκές υλικό** (≥ 2 ml βιολογικού υγρού) αποστέλλεται στο εργαστήριο.

Ανεπαρκές υλικό μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα.

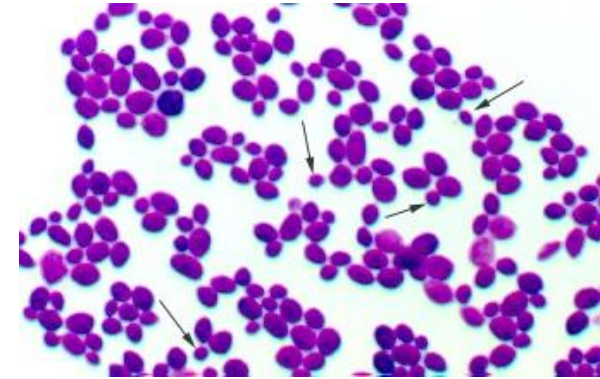
- Σε νεκρωτική εσχάρα, **λήψη υλικού κάτω από τη νέκρωση**
- Μεταφορά του υλικού εντός 2 h και άμεση επεξεργασία.
- Σε καθυστέρηση, **συντήρηση ούρων σε 4°C (αίμα, μυελός, ΕΝΥ και ιστός συντήρηση στους 35-37°C).**
- Ιδανικά, συλλογή δείγματος με την έναρξη εκδήλωσης συμπτωμάτων και προ της έναρξης αντιμυκητιακών.
- **Αποφυγή επιμόλυνσης** και διασφάλιση ασφάλειας του προσωπικού που τα διαχειρίζεται.

Συνθήκες μεταφοράς για διάγνωση μυκητιακών λοιμώξεων

Υλικό	Συνθήκες μεταφοράς
Πτύελα	Αποστειρωμένος συλλέκτης
Βρογχοσκοπικό υγρό	Αποστειρωμένος συλλέκτης
ΕΝΥ	Σε καθυστέρηση επεξεργασίας του δείγματος, το υλικό θα πρέπει να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου
Ούρα	Σε καθυστέρηση >2hrs, συντήρηση σε 4°C
Αίμα	Ειδικές φιάλες αιμ/γειών για μύκητες με Biphasic agar broth
Βιοψία ιστού	Το υλικό δεν πρέπει να ψυχθεί ή να αφυδατωθεί πριν την καλ/γεια

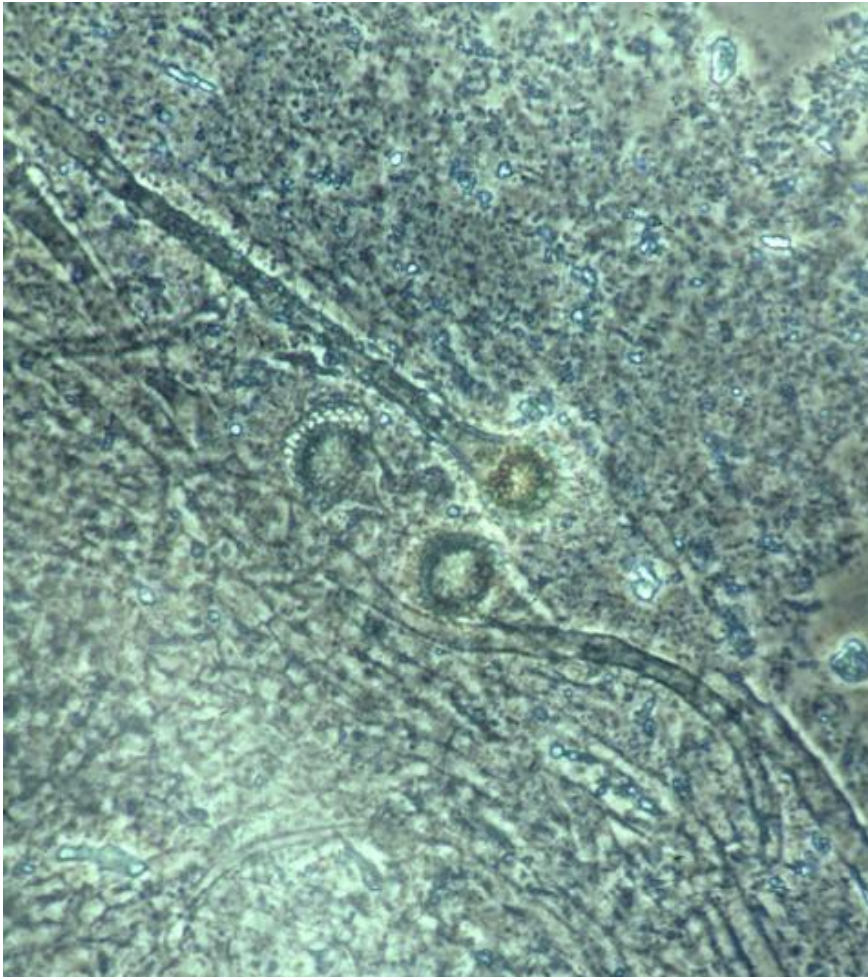
1. Άμεση μικροσκόπηση

Gram χρώση – οι μύκητες είναι gram θετικοί μικροοργανισμοί

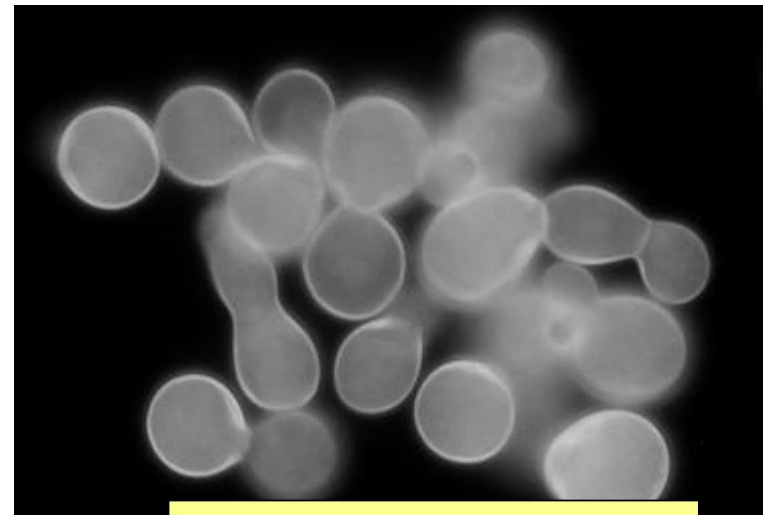


- Ιστοπαθολογία
 - χρώση ρουτίνας – Hematoxylin & Eosin (HE)
 - ειδικές χρώσεις – PAS (Per Iodic acid), GMS (Grocott Gomori Methanamine Silver), Mayer's mucicarmine, Gridley's stain
- Χρώση φθορίζουσα αντισωμάτων (Fluorescent)
 - Ανίχνευση Ag μυκήτων σε κλινικό υλικό, such όπως πύο, αίμα, ENY, ιστούς

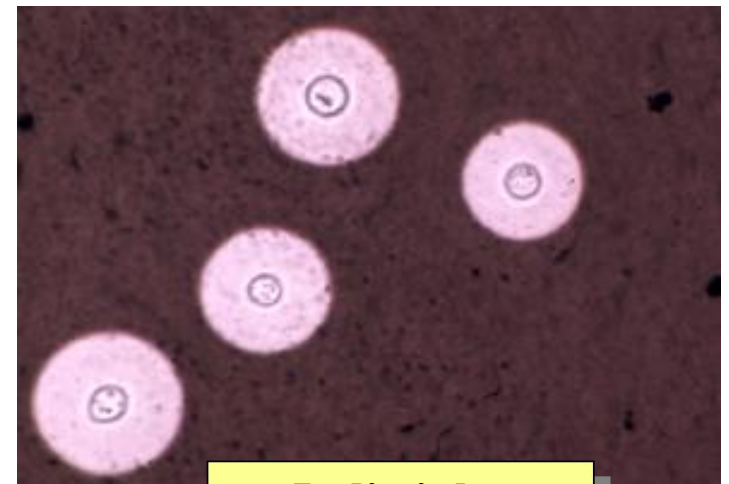
Άμεση μικροσκόπηση



KOH - Aspergillus

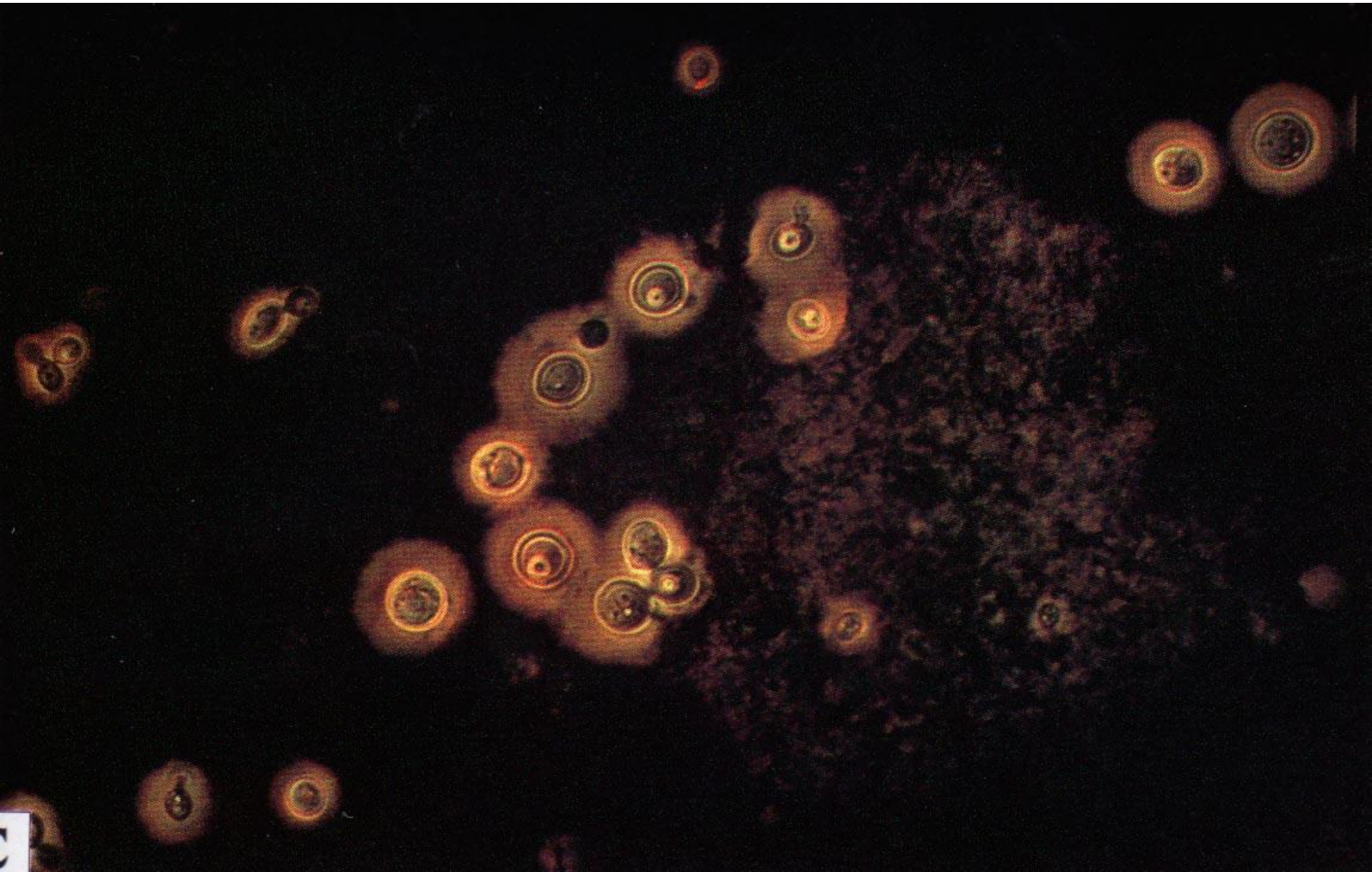


**CFW – yeast form of
Blastomyces**



**India ink -
Cryptococcus**

Cryptococcus neoformans

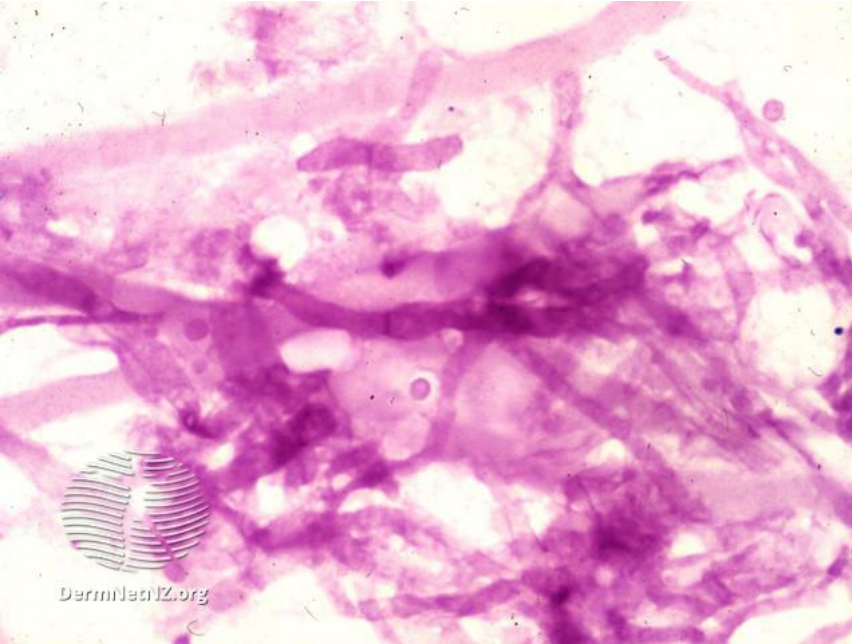


Cryptococcus neoformans

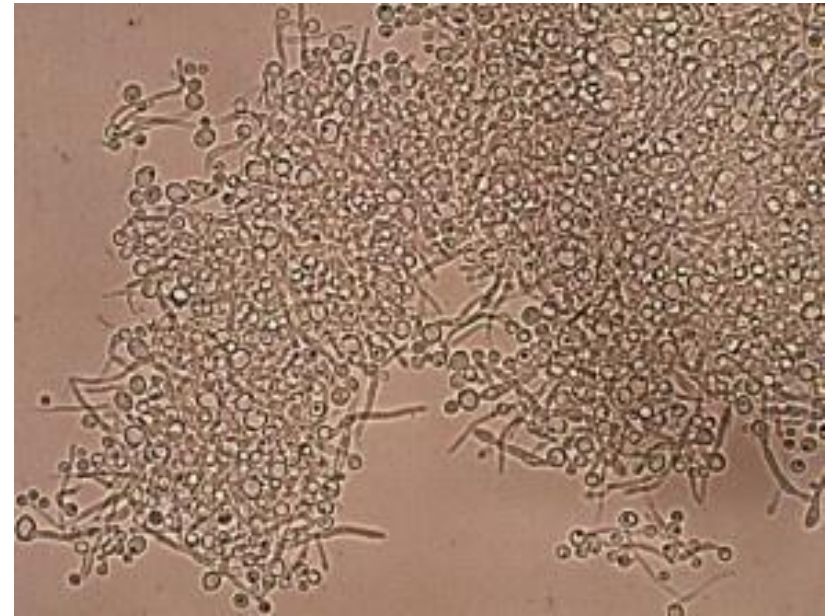
Raised skin lesions



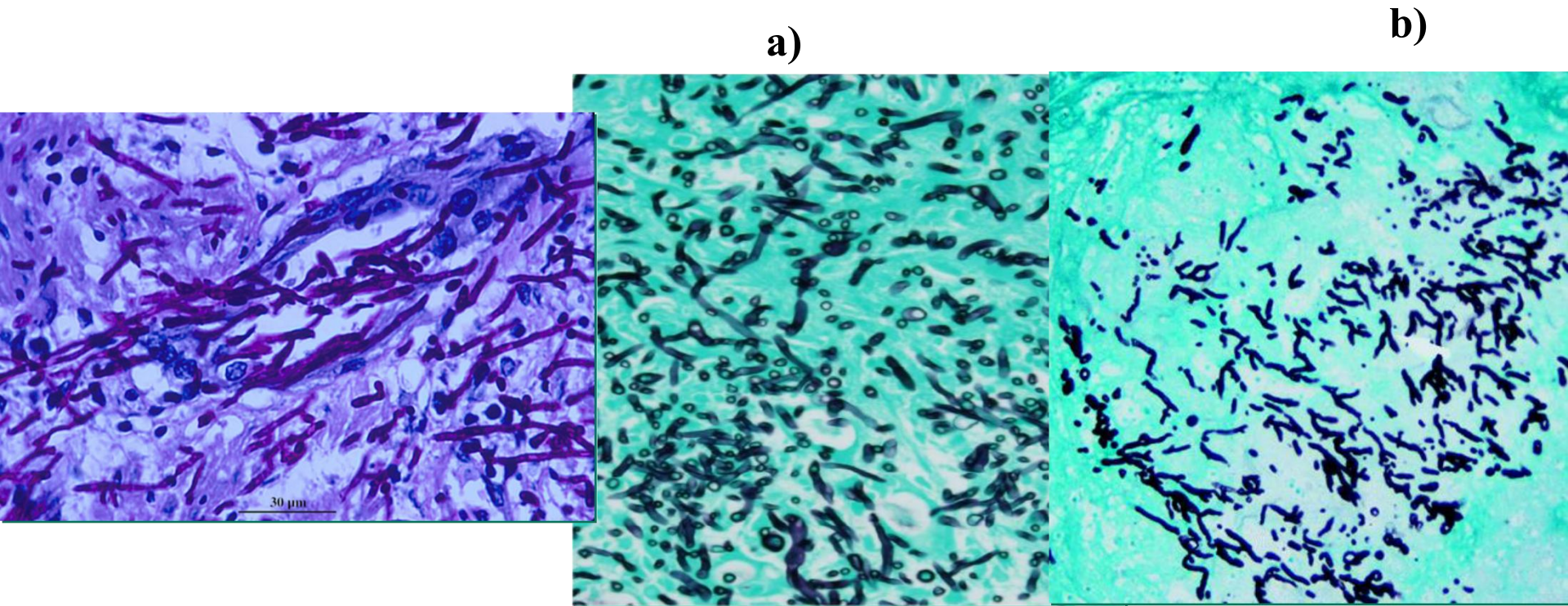
Άμεση μικροσκόπηση



PAS χρώση σε aspergillus σε βιοψία
δέρματος



candida με KOH



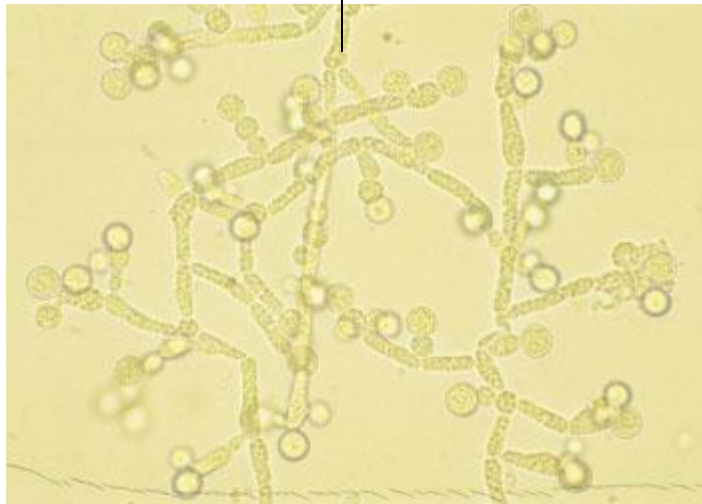
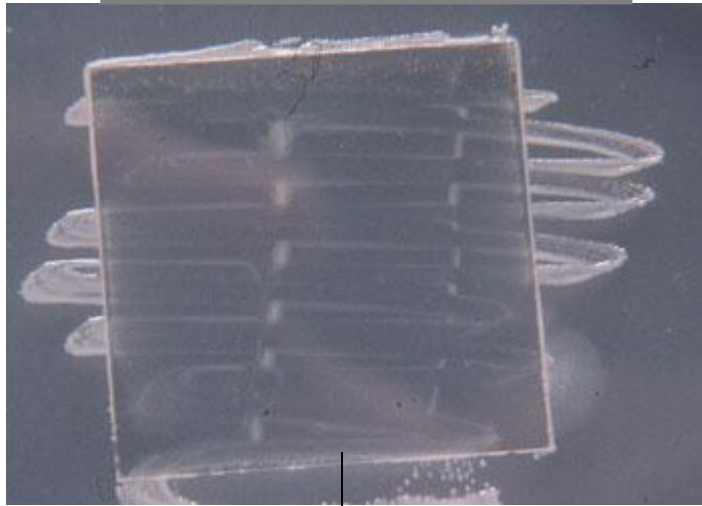
PAS χρώση για διηθητική καντιντίαση
(Mohammadi *et al*, 2015).

Grocott's χρώση για μύκητες σε
ιστοπαθολογικό δείγμα ιστού.
Mucor sp (a) *Aspergillus fumigatus*
(b)(Cho *et al.*, 2007; Chow *et al.*, 2015).

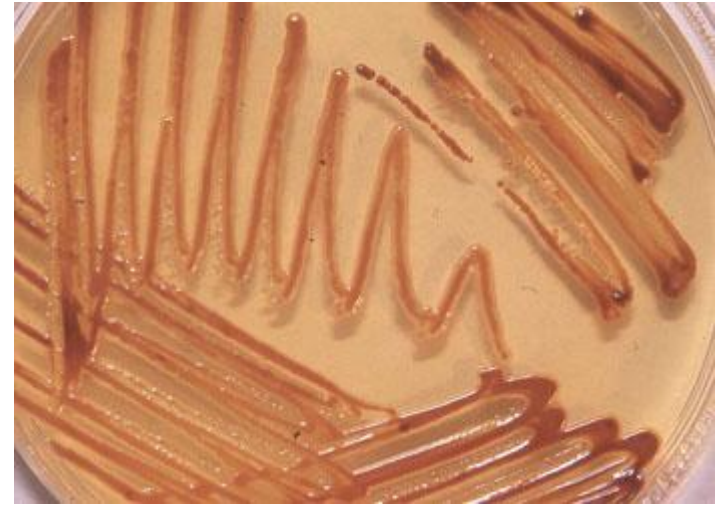
2. Καλλιέργεια μυκήτων

- Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
 - περιέχει 2% dextrose, αντιμικροβιακά (gentamicin, chloramphenicol) και cycloheximide
- Εκλεκτικά υλικά
 - Corn meal agar (CMA) – σε παρουσία γλαυδοσπορίων
 - Bird seed agar – cryptococcus, σχηματίζει καφεόχρες αποικίες
 - Brain Heart Infusion (BHI) agar – δίμορφοι & άλλοι βραδέως αναπτυσσόμενοι μύκητες

Corn Meal Agar



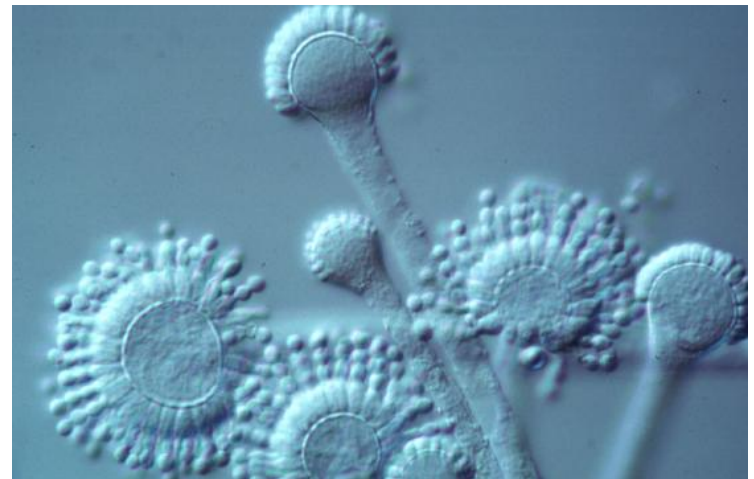
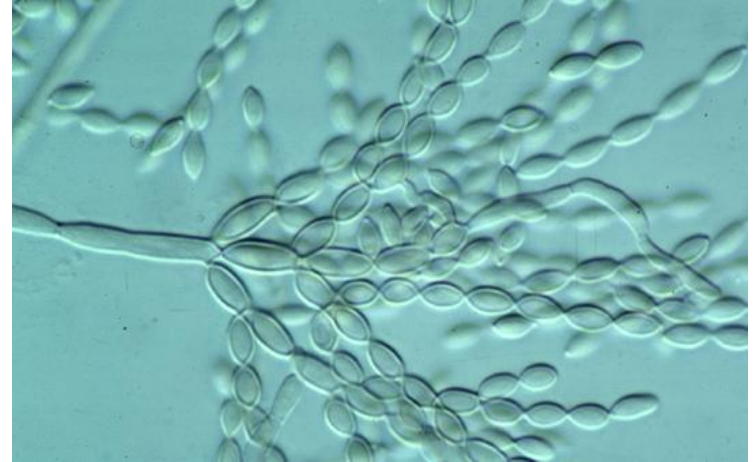
Καλλιέργεια μυκήτων

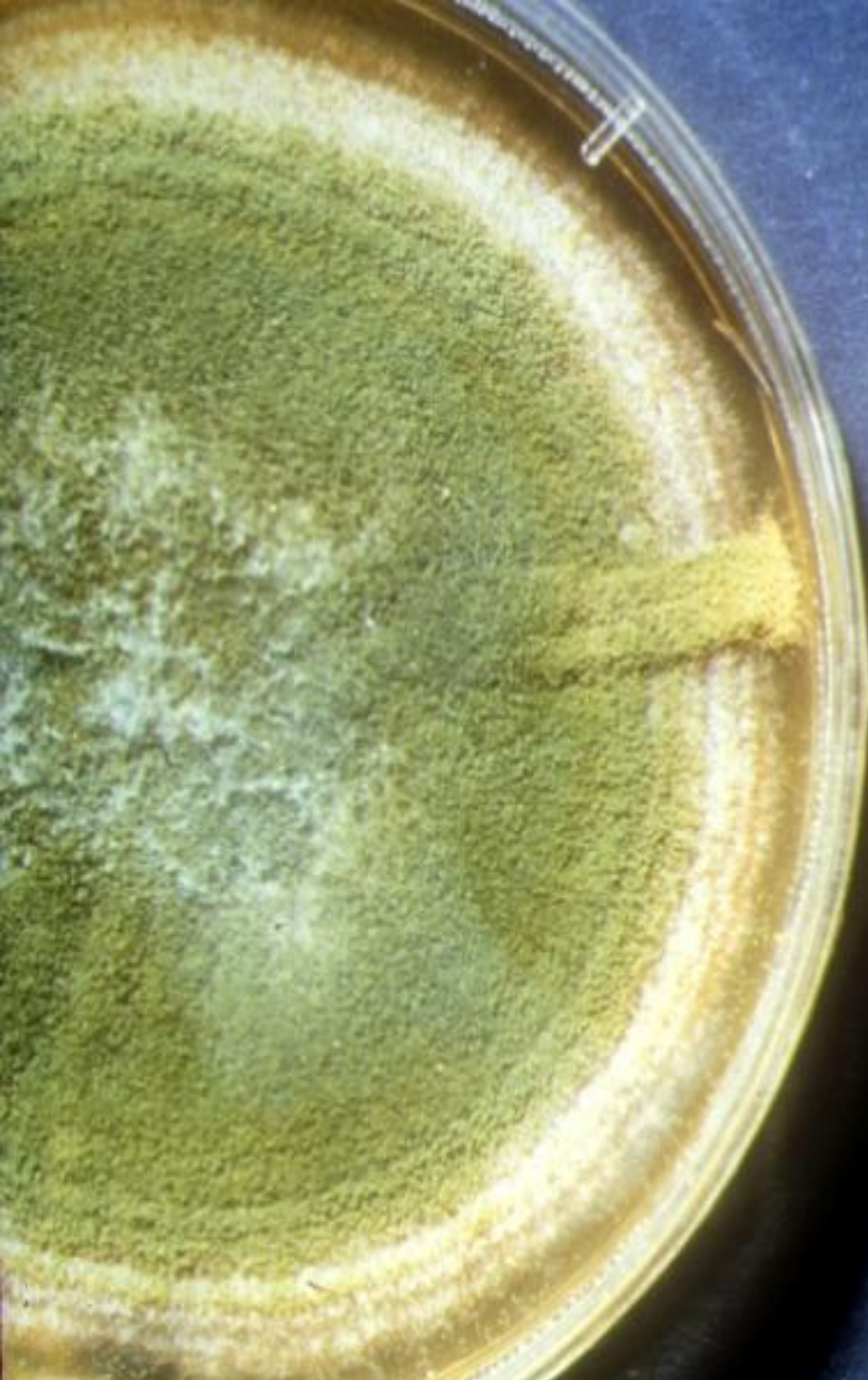


Bird Seed Agar

Απομόνωση μυκήτων σε καλ/γυειες

- Μορφολογία μυκήτων
μικροσκόπιο – με χρήση
Lactophenol Cotton Blue
(LPCB) χρώση
- Σύσταση LPCB
 - **Lactic acid** – διατηρεί τη δομή του μύκητα
 - **Phenol** – σκοτώνει κάθε ζώντα οργανισμό
 - **Glycerol** – εμποδίζει την ξηρότητα
 - **Cotton blue** – προσδίδει μπλέ χρώμα



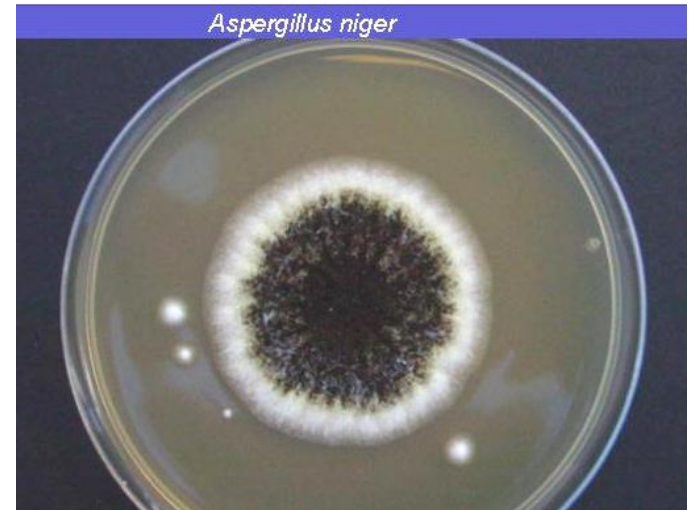
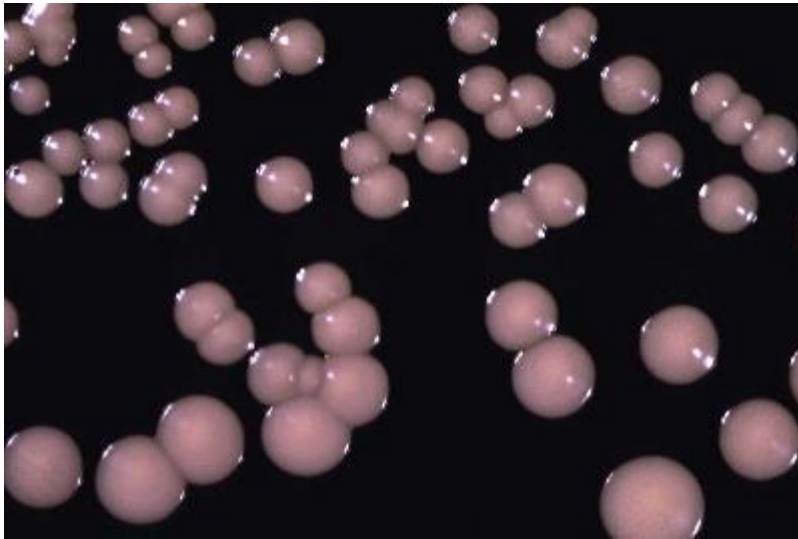


ΕΜΒΟΛΟ ΑΠΟ *ASPERGILLUS*

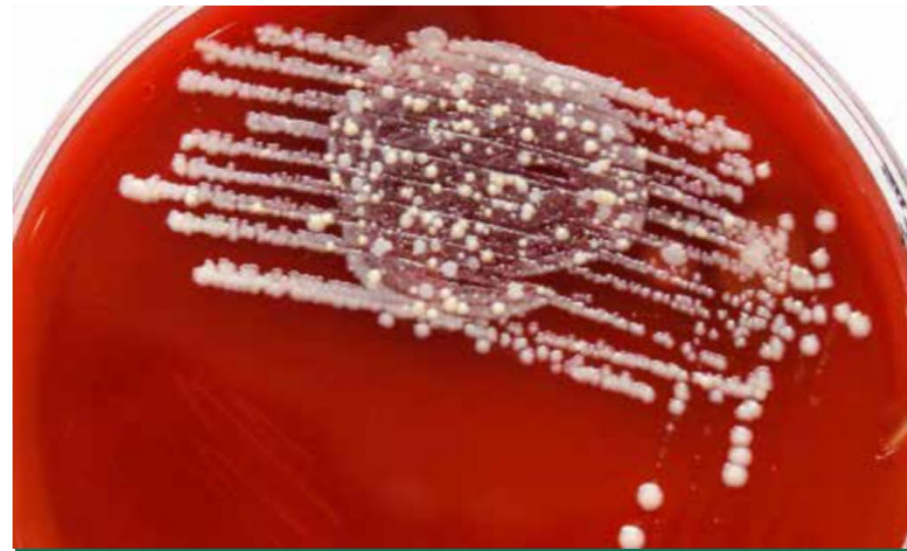


Απομόνωση μυκήτων από καλλιέργεια

Μορφολογία αποικιών – χρώμα, υφή, παραγωγή χρωστικής



Μυκητιασική οισοφαγίτιδα



Αιματούχο άγαρ
Candida albicans

C. auris

C. auris, culture on BiGGY agar



Close-up view shows small to medium oval yeasts

C. auris, culture on BiGGY agar



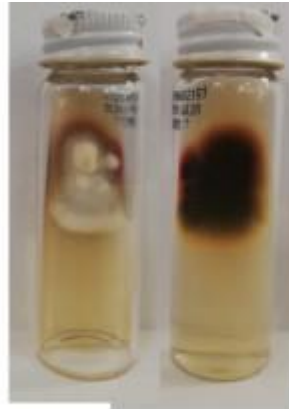
Susceptibility testing



Καλλιέργεια μυκήτων



Σωληνάρια με Agar
για καλλιέργεια
δερματόφυτων

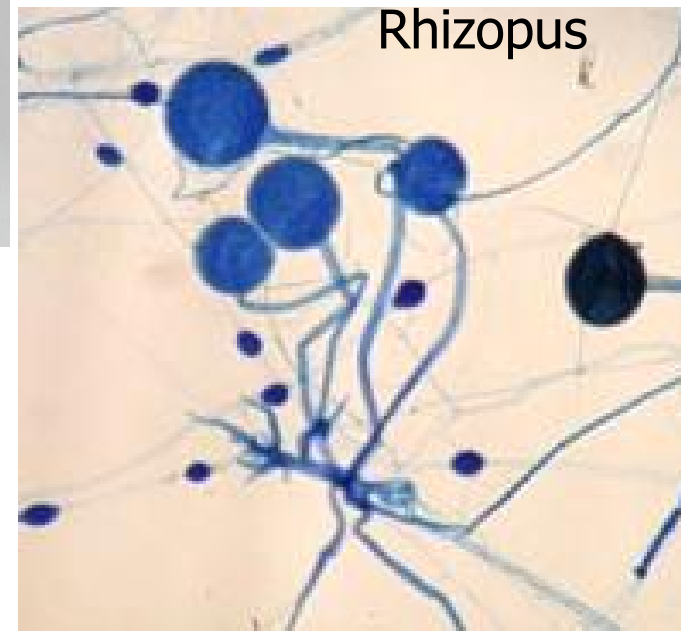
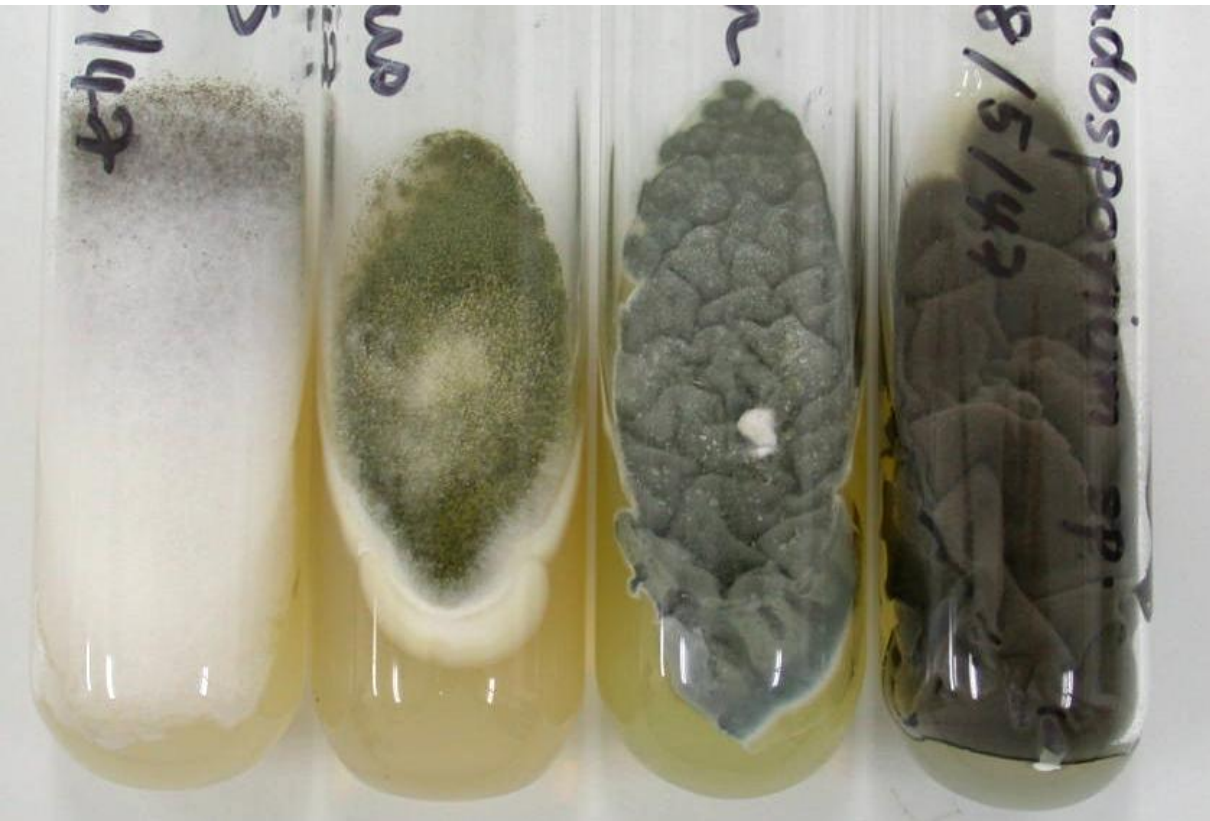


Καλλιέργεια
*Trichophyton
rubrum* σε
agar

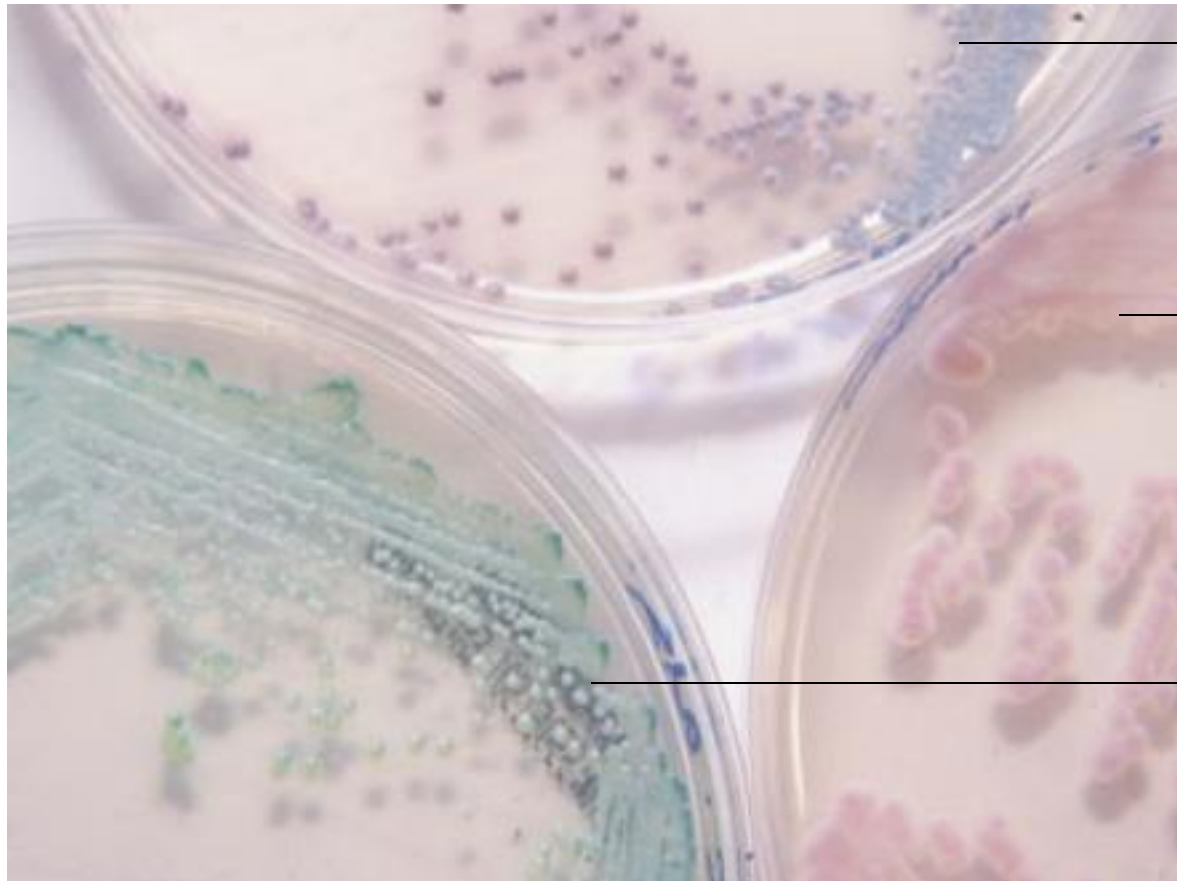


Rhodotorula

ΥΦΟΜΥΚΗΤΕΣ



Απομόνωση ειδών
Ειδικές τεχνικές



C.tropicalis

C.krusei

C.albicans

CHROM Agar

Ταυτοποίηση ειδών Candida

Αυτοποιημένες μέθοδοι (βιοχημικές αντιδράσεις)

Οι πλέον χρησιμοποιούμενες, εμπορικά διαθέσιμες:

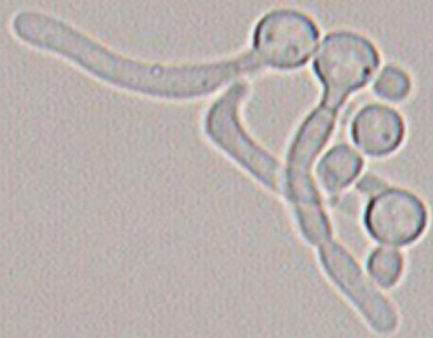
- Auxacolor system (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, France)
- Vitek 2 system (Biomerieux, Marcy-l'Etoile France)
- API Candida (BioMerieux, Marcy-l'Etoile France).
- Σε μετανάλυση 26 μελετών, η ακρίβεια των συστημάτων ήταν 89% για την Auxacolor, 80% για την API ID32C και 93% για την Vitek 2 (Posteraro et al., 2015).

API



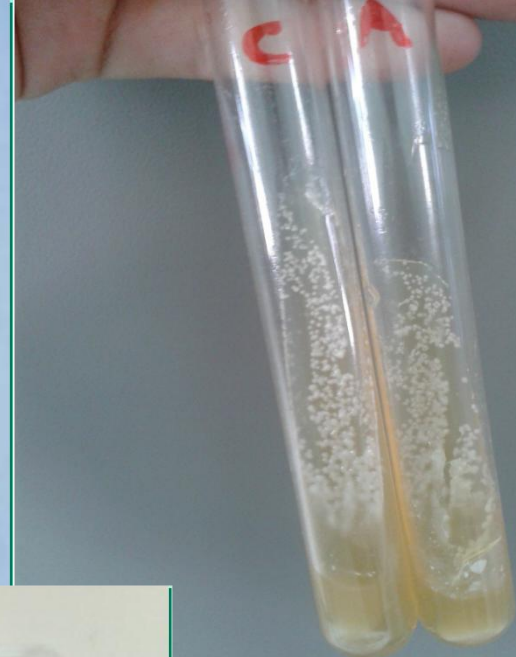
Vitek 2 system





10µm

Examen direct



Culture

AuxaColor™ 2 *Candida albicans*

C.Neg	GLU.	MAL.	SAC.	GAL.	LAC.	RAF.	INO.
CEL.	TRE.	ADO.	MEL.	XYL.	ARA.	HEX.	POX/PRO

REF 4A0190

LOT 26 GAD

Αυτοματοποιημένη μέθοδος VITEK 2 για ταυτοποίηση βακτηρίων και μυκήτων και τεστ ευαισθησίας



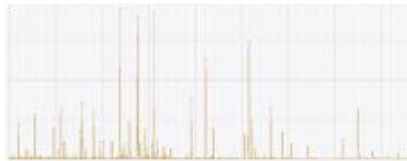
Νέα μέθοδος, η φασματομετρία μάζας MALDI TOF για ταχεία διάγνωση (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight).



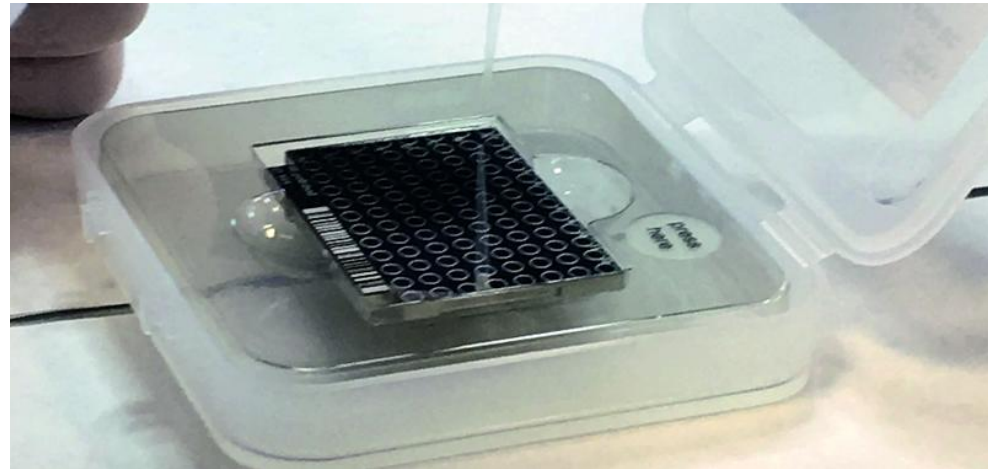
Spot colony on MALDI
plate, add matrix, dry
and place in machine



Import and clean up in
BioNumerics



Perform cluster analysis,
biomarker search,
identification,...



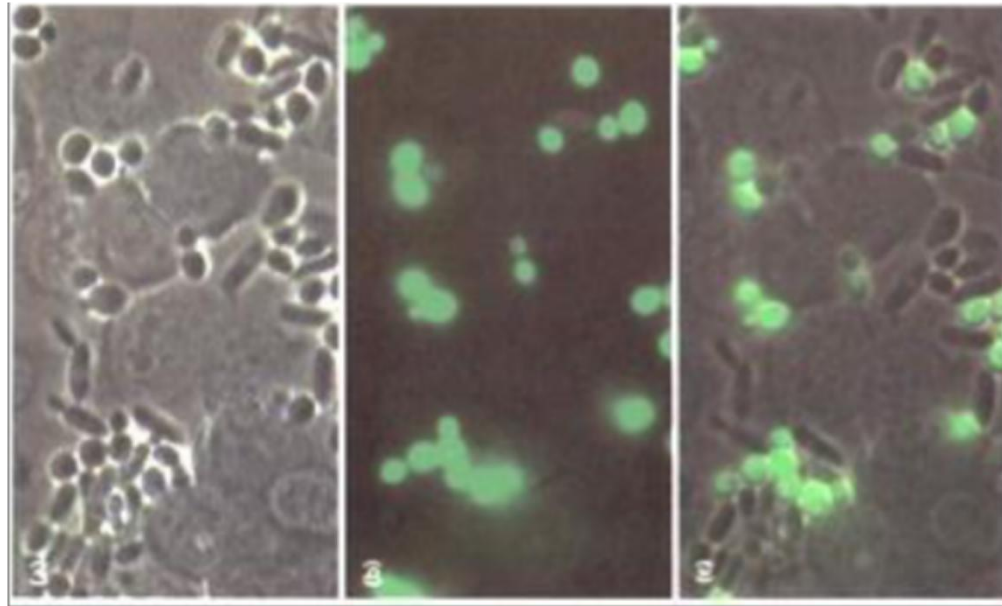
Fluorescence in situ hybridisation (FISH) για απομόνωση ζυμομυκήτων

-

(a)

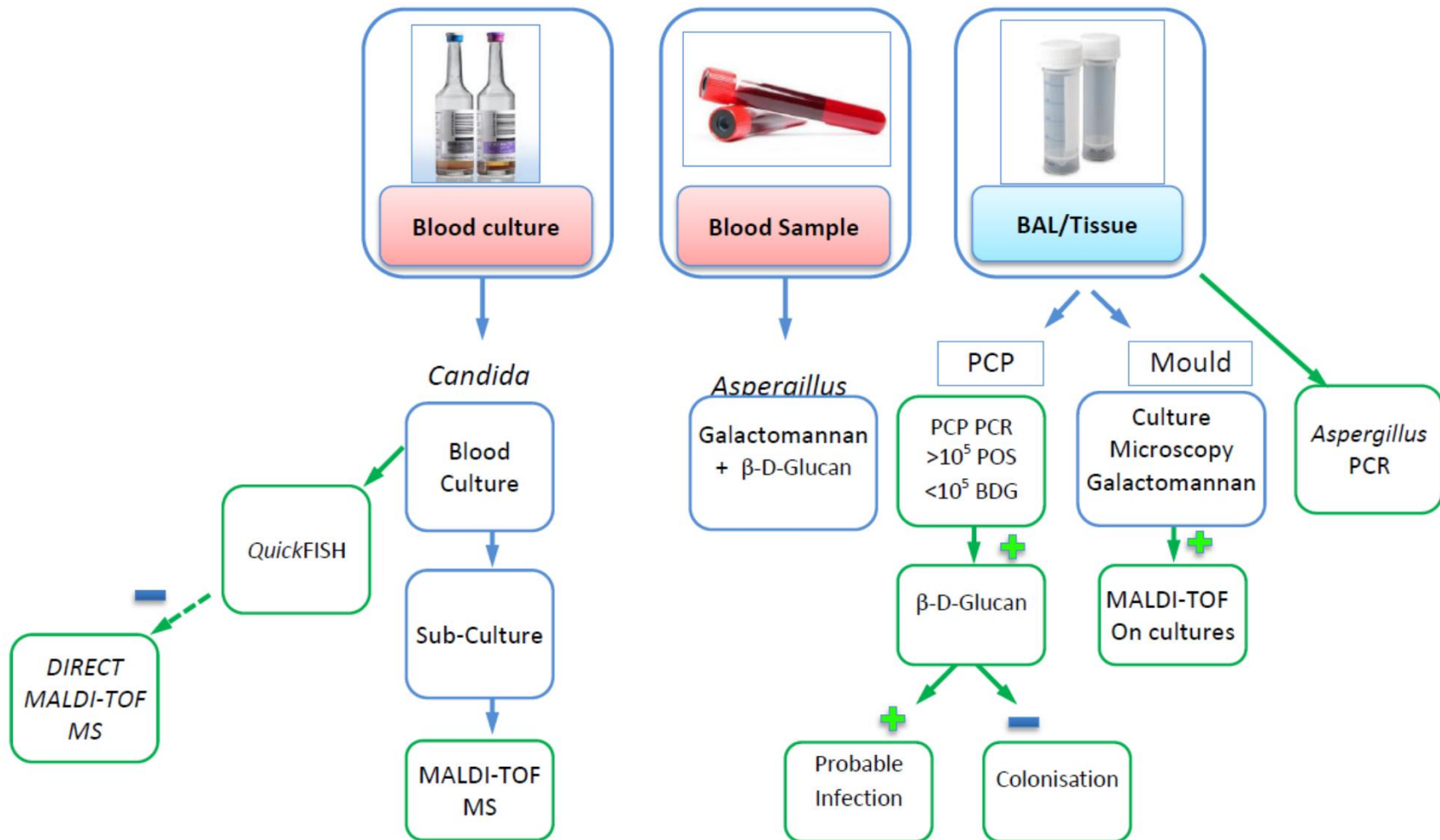
(b)

(c)



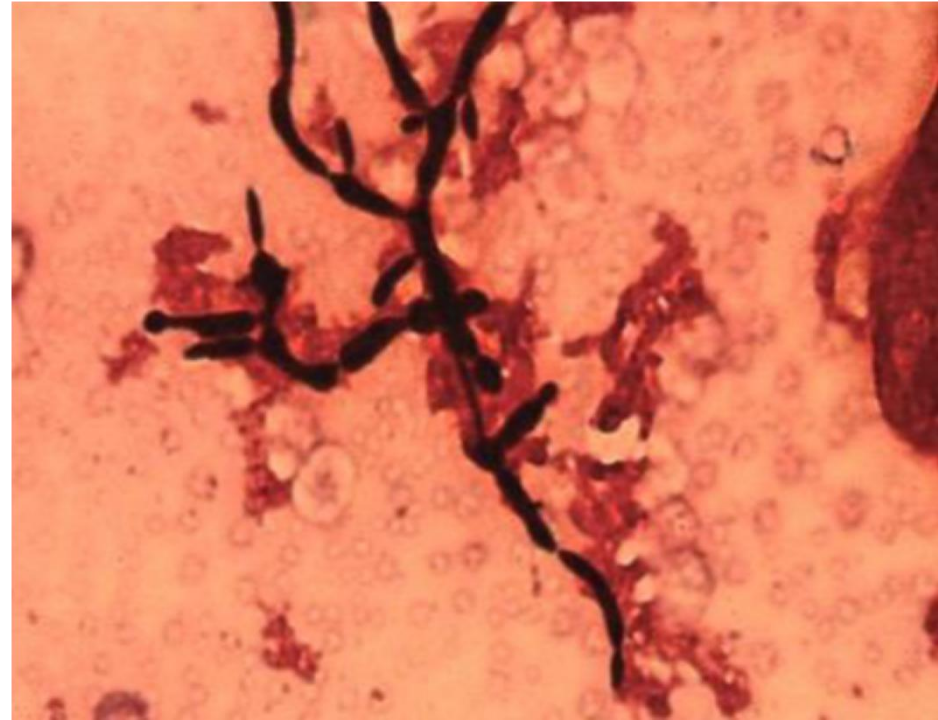
(a) Phase contrast micrograph showing the round *C. albicans* and the oval-shaped *C. krusei* adhering to the endothelial cells. (b) The same section viewed by fluorescence microscopy. (c) Double exposure of the phase contrast and fluorescence micrographs. Note that only the round *C. albicans* cells, but not the longer *C. krusei* cells are stained by the fluorescently labelled probe 020 (Lischewski et al., 1996).

Routine Diagnostic Service in the new HSL microbiology laboratory – 2017

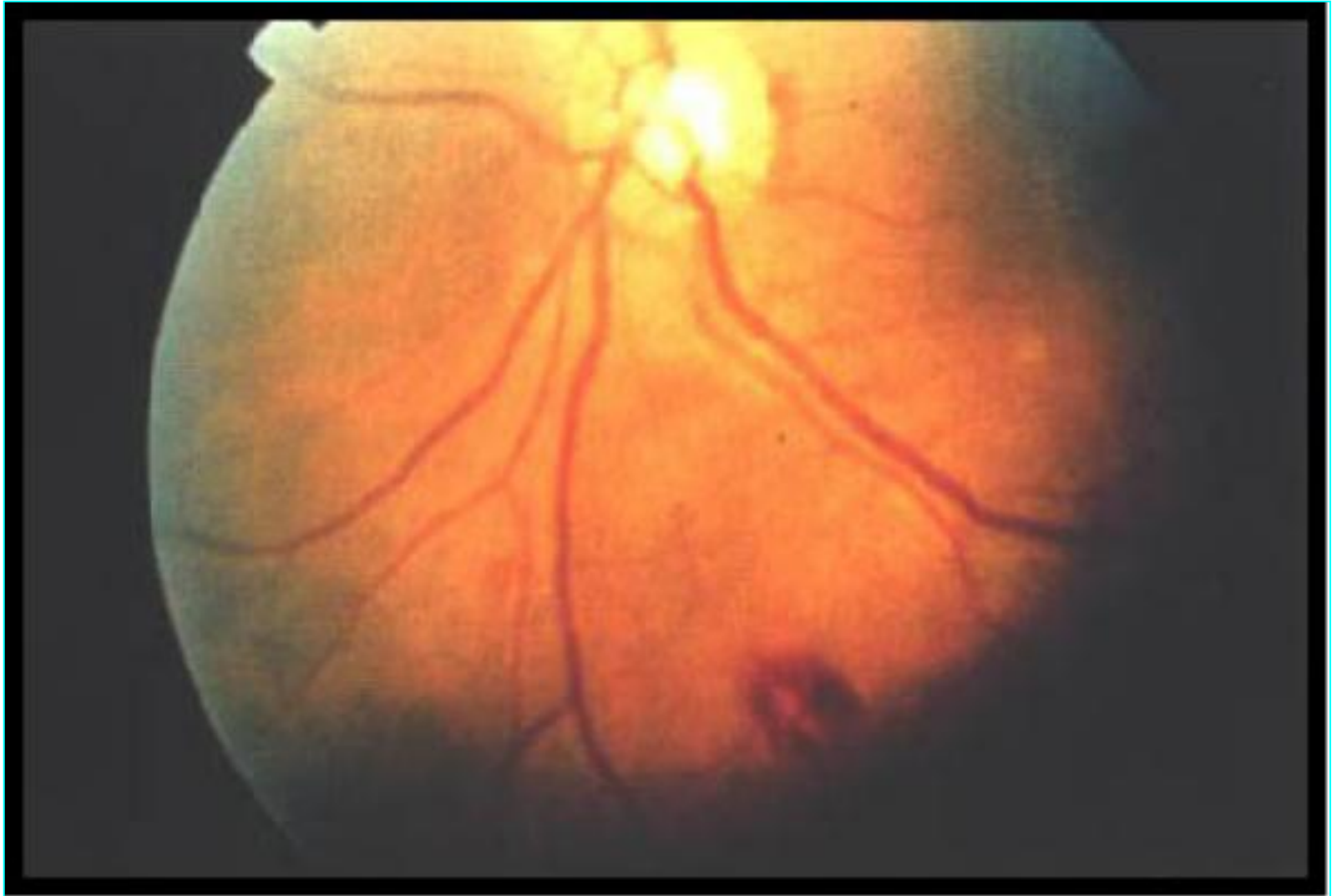


Καλλιέργεια αίματος για *Candida*

- Μόνο 35%-50% των ασθενών με μυκηταιμία έχουν θετική καλλιέργεια κατά την έναρξη των συμπτωμάτων
- Η λήψη προφύλαξης μειώνει την ευαισθησία
- > 72 ώρες για θετικοποίηση για *Candida* με κλασσικές μεθόδους
- Άλλες 48 ώρες για ταυτοποίηση – μυκητόγραμμα
- Σε ιστό ή βιολογικά υγρά
το standard of care είναι
μικροσκόπηση και καλλιέργεια
σε ειδικά θρεπτικά υλικά
(Schelenz *et al.*, 2009).



Καντινιασική ενδοφθαλμίτιδα



Εμπειρική και preemptive θεραπεία για καντιντίαση σε ΜΕΘ

• Εμπειρική

- ✓ « Candida score»
- ✓ Ostrosky-Zeichner prediction rule....

προσπάθεια συνδυασμού non-culture
τεχνικών

• Preemptive

- ✓ b-D-glucan
- ✓ Candida albicans germ tube antibodies (CAGTA)
- ✓ PCR
- ✓ CCI>0.4 (Piarroux et al)

Detection mannan and anti-mannan



EFISG

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESCMID FUNGAL INFECTION
STUDY GROUP

Mikulska et al. *Critical Care* 2010, **14**:R222
<http://ccforum.com/content/14/6/R222>



RESEARCH

Open Access

The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia

Malgorzata Mikulska^{1*}, Thierry Calandra², Maurizio Sanguinetti³, Daniel Poulain⁴, Claudio Viscoli⁵,
the Third European Conference on Infections in Leukemia Group

14 studies, 453 patients and 767 controls

Platelia Ab

Ag

Both

Sensitivity

58%

59%

83%

Specificity

93%

83%

86%

**+ prior
culture**

6 days in average

Detection mannan and anti-mannan



EFISG

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESCMID FUNGAL INFECTION
STUDY GROUP

Mikulska et al. *Critical Care* 2010, **14**:R222
<http://ccforum.com/content/14/6/R222>



RESEARCH

Open Access

The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia

Malgorzata Mikulska^{1*}, Thierry Calandra², Maurizio Sanguinetti³, Daniel Poulain⁴, Claudio Viscoli⁵,
the Third European Conference on Infections in Leukemia Group

14 studies, 453 patients and 767 controls

Platelia Ab

Ag

Both

500%

500%

200%

Chronic disseminated candidiasis:

21 cases, 86% S

16 days prior culture

6 days in average

+

pre_culture

ECCMID GUIDELINES 2011

What are the best tests for diagnosing candidaemia?

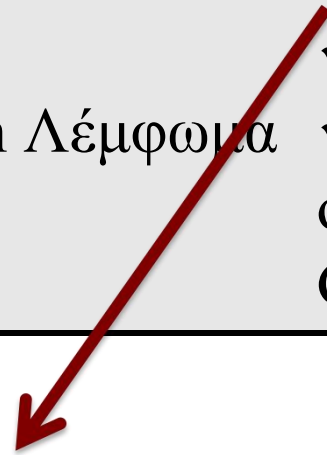
Specimen	Test	Considerations	Remarks/Recommendations
Serum	Mannan and Anti-Mannan	<ul style="list-style-type: none"> • Combined detection 	<p>RECOMMENDED Serial determinations may be necessary. High NPV</p>
	Other antibodies (such as Serion ELISA classic)	<ul style="list-style-type: none"> • Limited data for candidemia 	No recommendation
	β-D-Glucan	<ul style="list-style-type: none"> • Not specific for <i>Candida</i> 	<p>RECOMMENDED (for Fungitell) No recommendation for other tests. Serial determinations are recommended (twice a week). High NPV. Not validated in children</p>
	Septifast	<ul style="list-style-type: none"> • Limited data for candidemia 	No recommendation
	In house PCR	<ul style="list-style-type: none"> • No third party validation data available 	No recommendation

Ανεύρεση *Aspergillus* sp σε βρογχικές εκκρίσεις– τι σημαίνει?

- Αποικισμός ?
- Αλλεργία?
- Λοίμωξη?

Κίνδυνος οξείας διηθητικής ασπεργίλλωσης σε ασθενείς με αιματολογικό νόσημα

Χαμηλός	Ενδιάμεσος	Υψηλός
Αυτό-HSCT	ΟΛΛ	✓ ΟΜΛ (1st induction)
Λ.Hodgkin	ΧΛΛ	✓ ΜΔΣ – θεραπεία ΟΜΛ
ΧΜΛ	Μη Hodgkin Λέμφωμα	✓ Αλλογενής HSCT
Πολλ. Μυέλωμα	ΜΔΣ	ουδετεροπενία GvHD



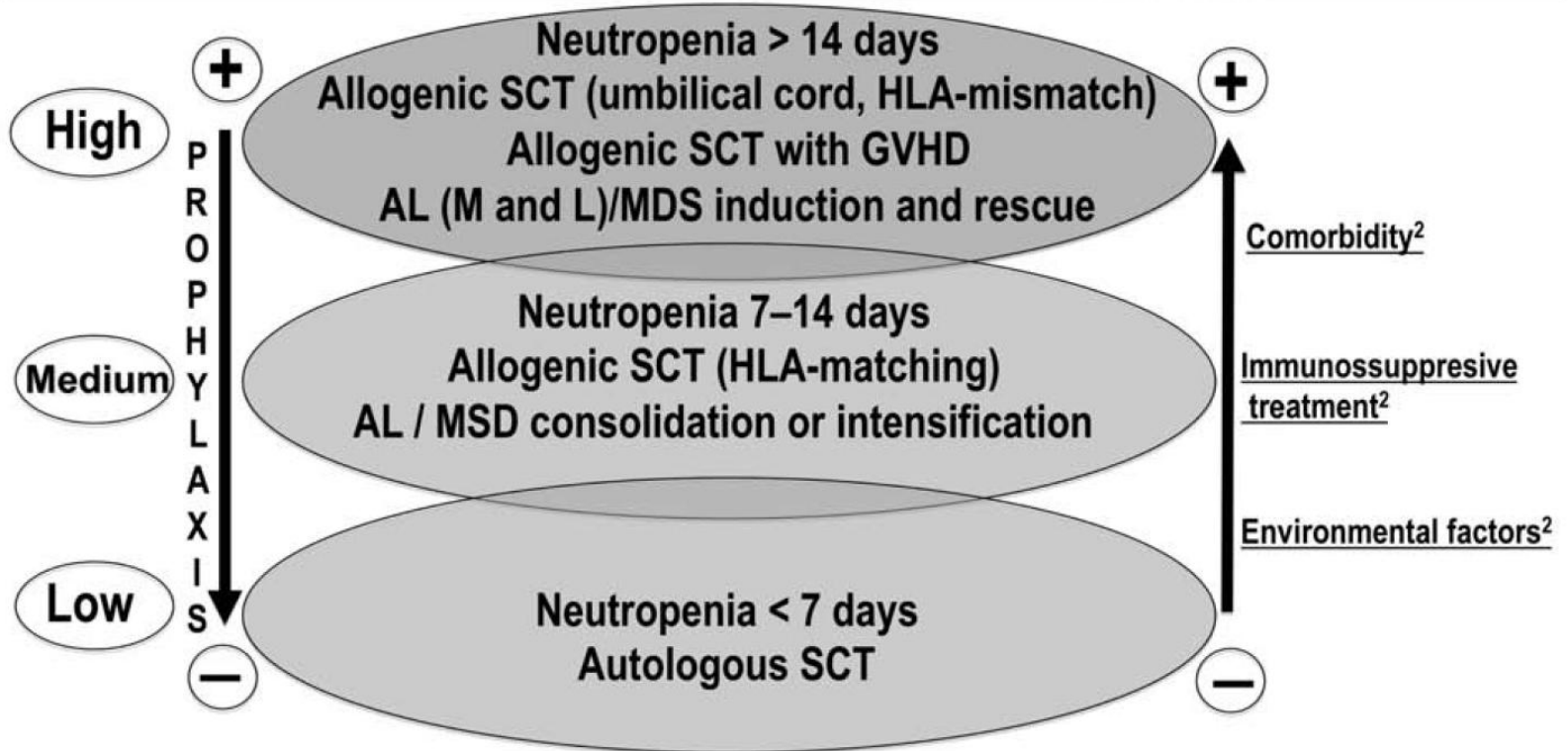
Leukemia status

relapse-refractory > 1st induction > consolidation

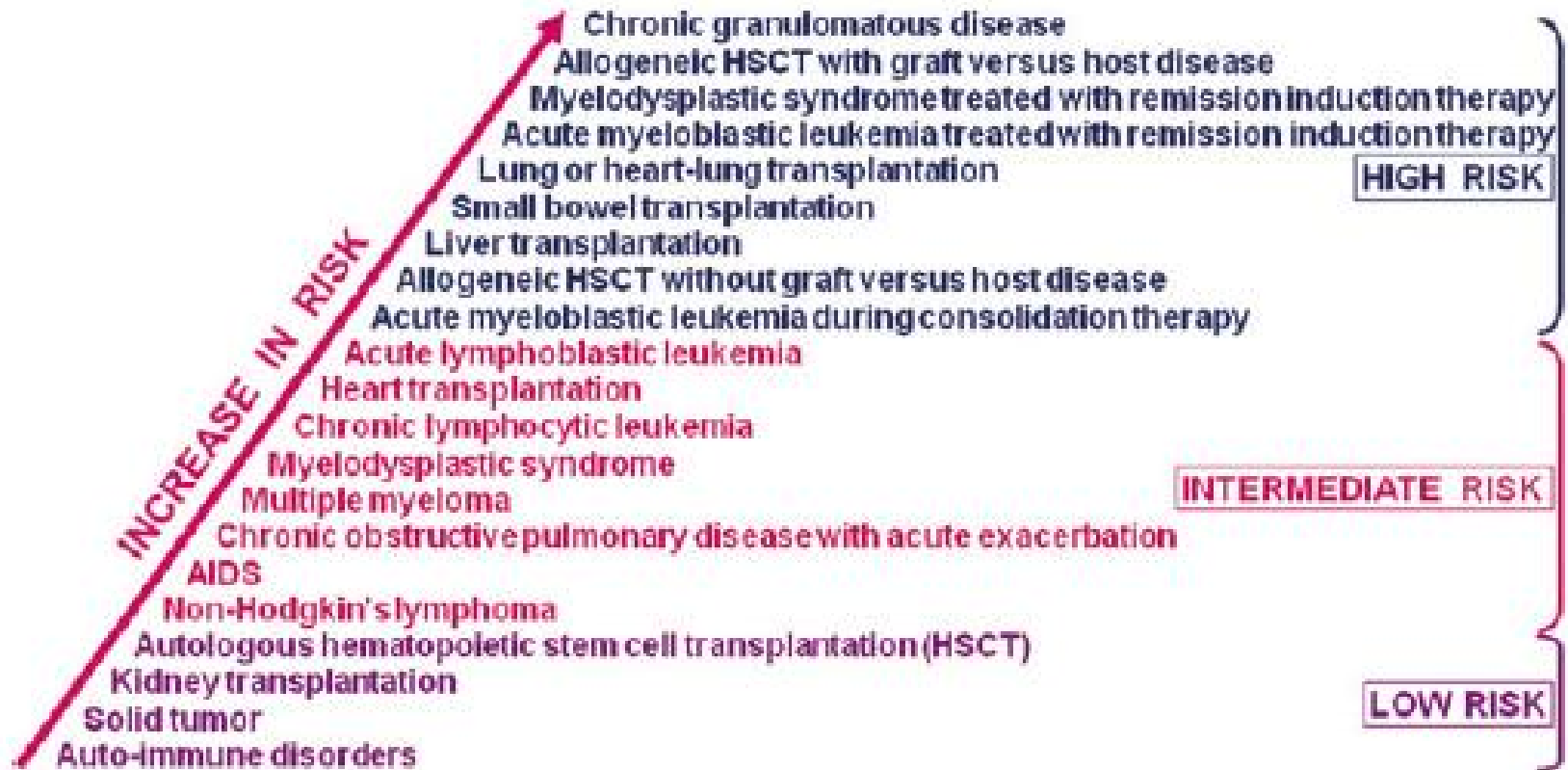
Van de Peppel RJ et al, Med Mycol. 2014;52(7):699-705

Pagano L, et al. JAC 2011; 66: 15.

Risk of IFI	Primary risk factors	Secondary risk factors ¹
-------------	----------------------	-------------------------------------



Risk of invasive aspergillosis based on the primary host factor



Risk Factors for IFI apart the haematological malignancy....

**Host
predisposition**

**Neutropenia
≥3 weeks**

**Environmental
factors**

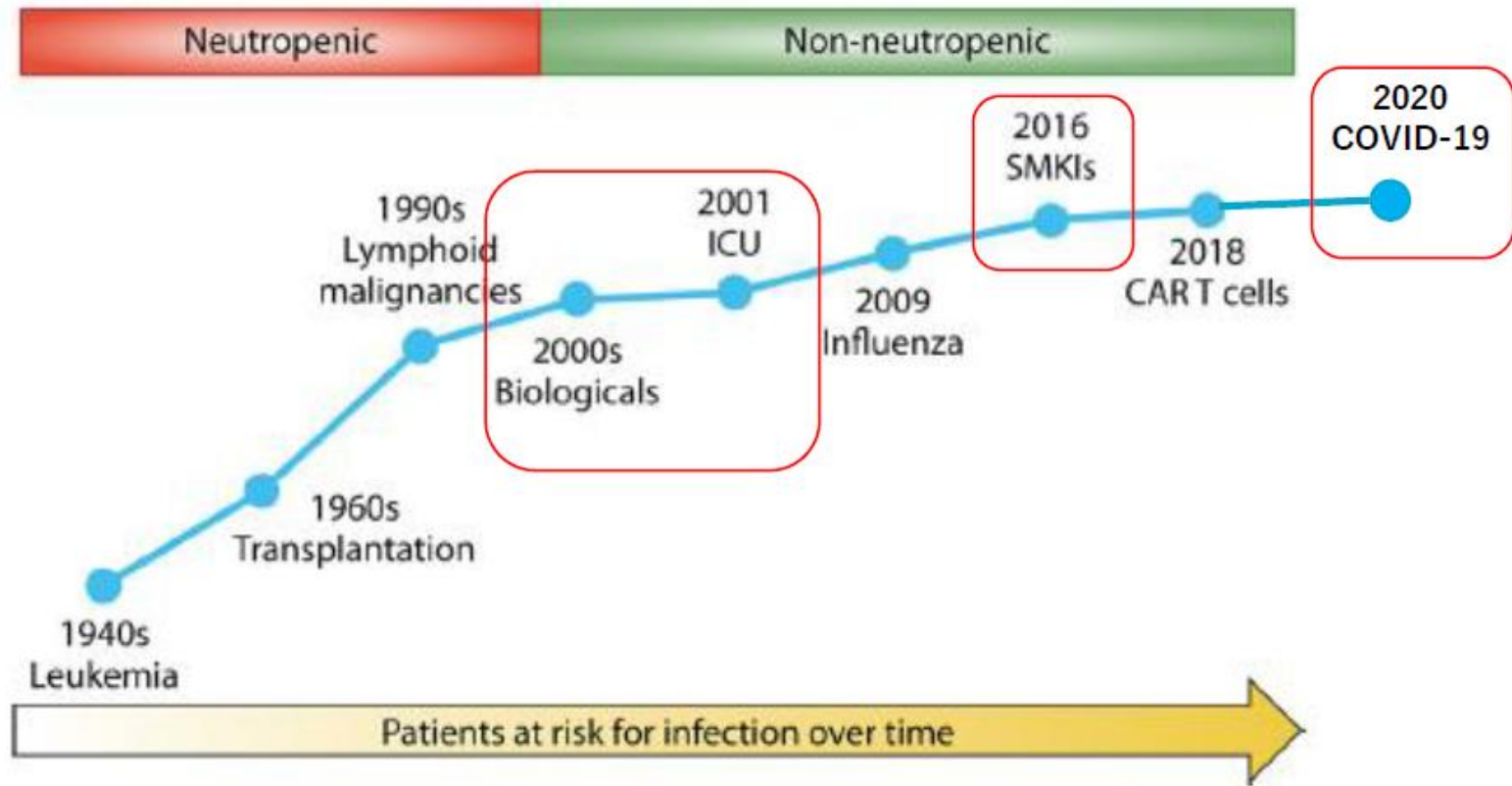
Οικοδομικές εργασίες! Σκόνη, κλιματισμός



Risk Factors for IFIs, IPA

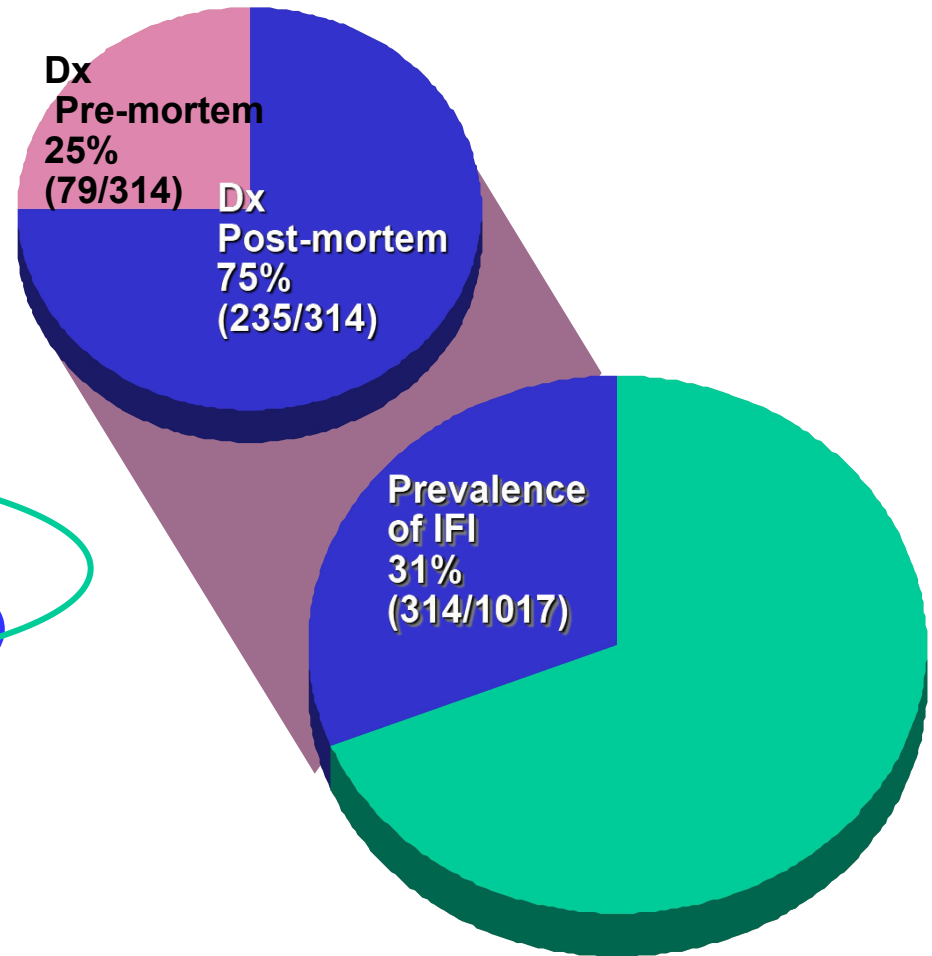
Classical risks	Non-classical risks	Novel risks
Prolonged neutropenia High dose corticosteroids Allo-HSCT Lung transplantation HIV with CD4 < 50 Neutrophil defect Chronic granulomatous disease	COPD Diabetes mellitus ICU stay Auto-HSCT Non-lung organ transplant Severe burns Chronic liver disease Malnutrition	Biologic agents Monoclonal antibodies Kinase inhibitors Viral pneumonia

Non-Classical/New Risks of IA



Επίπτωση μυκητιακών λοιμώξεων σε νεκροψία σε ασθενείς με αιματολογική κακοήθεια

- Autopsy review of 1017 patients with hematologic malignancies (1989-2003)
- EORTC/MSG criteria used to diagnose IFI*
- Prevalence of IFI in all hematologic malignancies at autopsy = 31% (314/1017)
- Only 25% of these cases diagnosed pre-mortem



EORTC/MSG, European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group.

*Ascioglu S et al. *Clin Infect Dis*. 2002;34:7-14.

Chamilos G et al. *Haematologica*. 2006;91:986-989.

PROPHYLAXIS

EMPIRICAL

(PRE-EMPTIVE)
THERAPY

**invasive
fungal
infection
NOT
PRESENT**

**invasive
fungal
infection
NOT
EXCLUDED**

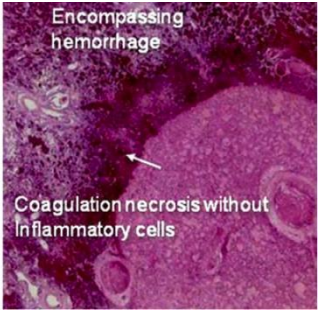
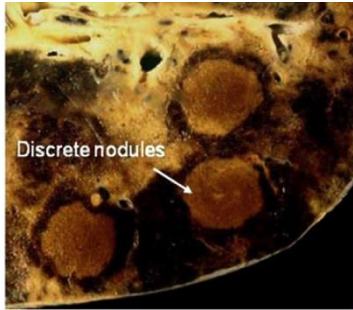
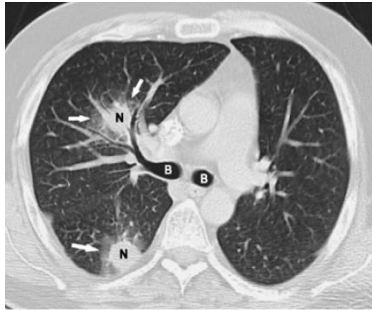
**invasive
fungal
infection
INCIPIENT**

Πρωτογενής προφύλαξη

Δευτερογενής προφύλαξη

**Πρώιμη έναρξη
Αντιμυκητιακού (AM)**

**Επαναχορήγηση AM, σε θεραπευθείσα
ΣΜ, επί ανοκαταστολής λόγω Χ/Θ
HSCT**



**Ορολογικά /
μοριακά**

**Σημεία και
συμπτώματα**

**Καλλιέργειες
Ιστολογικές**

Επιπλοκές

Πρώιμη

Εμπειρική

**Στοχευμένη
θεραπεία**

Επιπλοκές



Εμπύρετος ουδετεροπενία

Liposomal Ampho B

vs

D-Ampho B

Caspofungin

vs

Liposomal Ampho B

Voriconazole

vs

Liposomal Ampho B

Προφύλαξη

Posaconazole

Vs

Fluconazole
(GVHD)

Posaconazole

vs

Fluconazole or
itraconazole
(AML / MDS)

Στοχευμένη

Voriconazole

vs

Ampho B
deoxycholate
(Aspergillus)

Caspo

vs

Ampho B
(Candida)

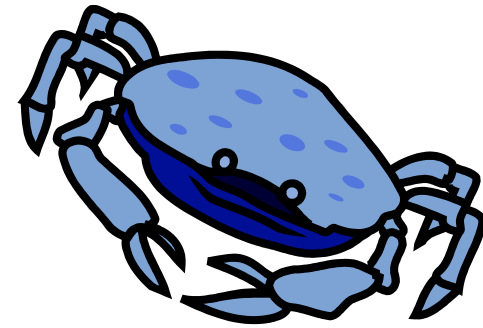
Anidula

vs

Flucon
(Candida)

Categories		2008 EORTC/MSG	2020 EORTC/MSG
Proven		Histopathology, culture from sterile samples or blood	Add: PCR from sterile samples
Probable	Host factors	Neutropenia Allgeniec HSCT Corticosteroids T cell immunosuppressants Inherited severe immunodeficiency	Add: Hematologic malignancy Solid organ transplant Treatment with recognized B-cell immunosuppressants Acute graft-versus-host disease grade III or IV
	Clinical Criteria	- Dense, well-circumscribed lesions(s) with or without a halo sign - Air-crescent sign - Cavity	Pulmonary mold infection - Add: Wedge-shaped and segmental or lobar consolidation Candidiasis - Small, target-like abscesses in liver or spleen (bull's-eye lesions) - Progressive retinal exudates or vitreal opacities
	Mycologic al Criteria	Direct test - Mold in sputum, BAL, bronchial brush, or sinus aspirate samples (microscopy/culture) Indirect tests - Galactomannan antigen (plasma, serum, bronchoalveolar lavage fluid, or CSF) - β -d-glucan detected in serum	Pulmonary mold infection Galactomannan antigen - Single serum or plasma: ≥ 1.0 - BAL fluid: ≥ 1.0 - Single serum or plasma: ≥ 0.7 and BAL fluid ≥ 0.8 - CSF: ≥ 1.0 Aspergillus PCR - Plasma, serum, whole blood o BAL x2 (or 1 BAL AND 1 blood) Candidiasis - β -D-glucan (Fungitell) ≥ 80 ng/L (pg/mL) X2 - Positive T2 <i>Candida</i>
Possible		Host factor + Clinical Criteria	N/A

(1→3)-β-D-glucan (BDG)



ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- **Κίνδυνος επιμόλυνση (η γλυκάνη ανευρίσκεται παντού)
ο αποικισμός δεν αυξάνει τα επίπεδα**

ΨΕΥΔΩΣ ΘΕΤΙΚΗ

- **Μεμβράνες αιμοκάθαρσης** (Miyazaki 1995, Yoshioka 1989)
- **Πολυμεταγγιζόμενοι**
- **Albumin** (Usami 2002, Ohata 2003)
- **Immunoglobulins** (Ogawa 2004)
- **Γάζες** (Kimura 1995)
- **Υπερχολερυθριναιμία, υπερτριγλυκεριδαιμία** (Pickering 2004)
- **Αντιμικροβιακά (amoxicillin-clavulanate)** (Mennink-Kersten 2006)
- **Λοιμώξεις από *Pseudomonas aeruginosa*** (Mennink-Kersten 2008)

Ερωτήματα BG

- (i) έλεγχος BG σε υψηλού κινδύνου ασθενείς (διαδοχικές μετρήσεις δις ή τρις εβδομαδιαίως κατά τη διάρκεια κινδύνου για IFD vs άπαξ μέτρησης σε υποψία για IFD)
- (ii) διαγνωστική αξία σε αλλογενή HSCT, παιδιατρικούς ασθενείς, IFD σε διαφορετικές εστίες, βιολογικά υγρά πλην αίματος (BAL, ENY)
- (iii) διαδοχική μέτρηση αυτού του ‘panfungal’ βιοδείκτη σε συνδυασμό με άλλους fungus-specific markers
- (iv) χρόνος διάγνωσης και (v) αξία για follow-up IFD.
 - Προσοχή σε **ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα**
 - **υπό αντιμυκητιακή προφύλαξη ή θεραπεία**
 - **παθογόνοι μύκητες που δεν ανιχνεύονται με BG, όπως zygomycetes και Cryptococcus, μη διηθητική νόσος και ψευδώς θετικά αποτελέσματα.**



EFISG

ESCMID FUNGAL INFECTION
STUDY GROUP

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Diagnostic Performance of the (1→3)- β -D-Glucan Assay for Invasive Fungal Disease

Sophia Koo,^{1,2,3} Julie M. Bryar,^{1,4} John H. Page,⁴ Lindsey R. Baden,^{1,2,3} and Francisco M. Marty^{1,2,3}

¹Brigham and Women's Hospital, ²Dana-Farber Cancer Institute, ³Harvard Medical School, and ⁴Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts

Clinical Infectious Diseases 2009;49:1650-9

A total of 1308 BG assays were performed for 871 patients. 228 proven or probable IFD

Sensitivity 64%, specificity 84%. Positive likelihood ratio was 3.93 and the negative likelihood ratio was 0.43

**FP: Albumin, intravenous immunoglobulin, and hemodialysis
Empirical systemic antifungal treatment did not reduce overall BG sensitivity.**

Sensitivity was slightly lower among patients with hematologic malignancy or stem cell transplantation

Μοριακές τεχνικές διάγνωσης

Mycopathologia (2016) 181:623–624
DOI 10.1007/s11046-016-0033-4



GUEST EDITORIAL

Has *Aspergillus* PCR Come to the Age of Maturity?

Alessandro C. Pasqualotto · Diego R. Falci

How Should Galactomannan and (1→3)-β-D-Glucan Be Used for the Diagnosis of Aspergillosis?

IDSA 2016: Recommendations.



- 9. Serum and BAL galactomannan (GM) is recommended as an **accurate marker** for the diagnosis of IA in adult and pediatric patients when used in certain patient subpopulations (hematologic malignancy, HSCT) (*strong recommendation; high-quality evidence*).
- 10. GM is **not recommended for routine blood screening** in patients receiving **mold-active antifungal therapy or prophylaxis**, but can be applied to bronchoscopy specimens from those patients
(*strong recommendation; high-quality evidence*).
- 11. **GM is not recommended** for screening in **SOT recipients** or patients with chronic granulomatous disease (CGD) (*strong recommendation; high-quality evidence*).
- 12. Serum assays for **(1→3)-β-D-glucan are recommended** for diagnosing IA in **high-risk patients** (hematologic malignancy, allogeneic HSCT), but are not specific for Aspergillus (*strong recommendation; moderate-quality evidence*).

How Can Biomarkers Be Used to Assess Patient Response to Therapy?

IDSA 2016: Recommendations.



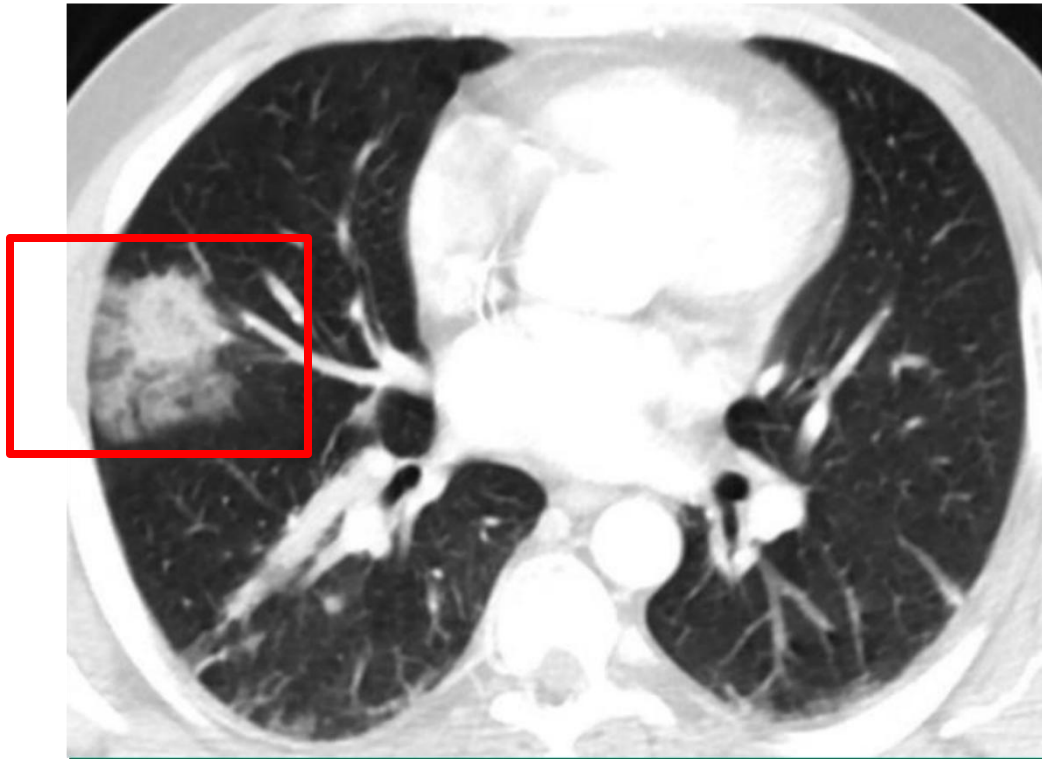
- 43. **Serial monitoring** of serum **GM** can be used in the appropriate patient subpopulations (hematologic malignancy, HSCT) who have an elevated GM at baseline **to monitor disease progression** and therapeutic response, and predict outcome (*strong recommendation; moderate-quality evidence*).
- 44. (1→3)- β -D-glucan has not been extensively studied in IA to predict outcome (*weak recommendation; low-quality evidence*).

**Probable aspergillosis?
No need to worry!**

**CT scan and
galactomannan
are there to help us out!**



Οξεία διηθητική ασπεργίλλωση ‘Halo sign’



Lung lesions with the halo appearance typical of pulmonary invasive aspergillosis due to a defined circumscribed lesion surrounded by ground glass shadowing (Sheetal Shroff *et al* 2014)

CT scan evolution during IPA

Peripheral halo

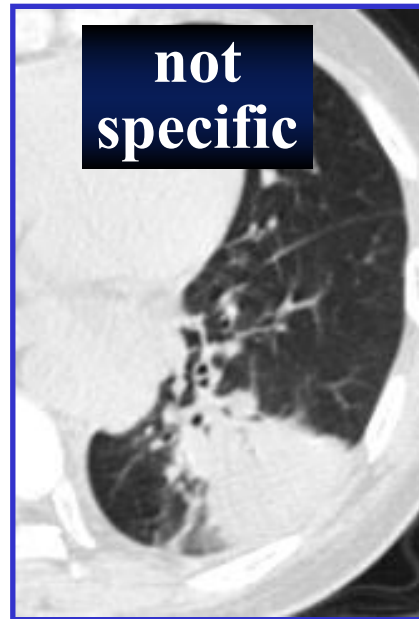
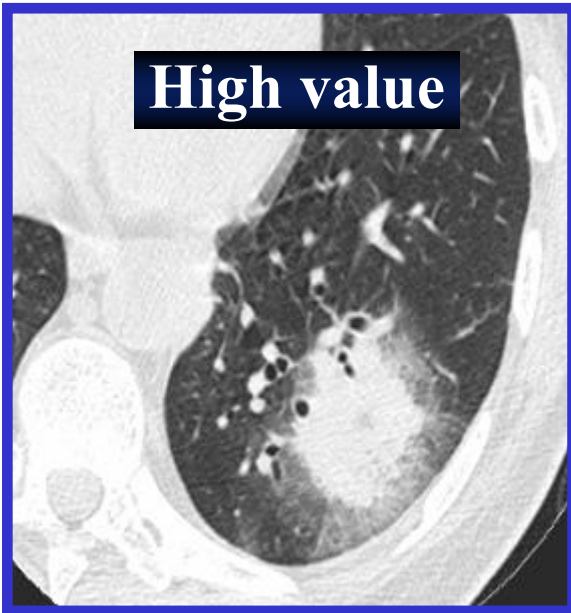
triangular shape

Air-crescent sign

d0 - d5

d5 - d10

d10 - d20

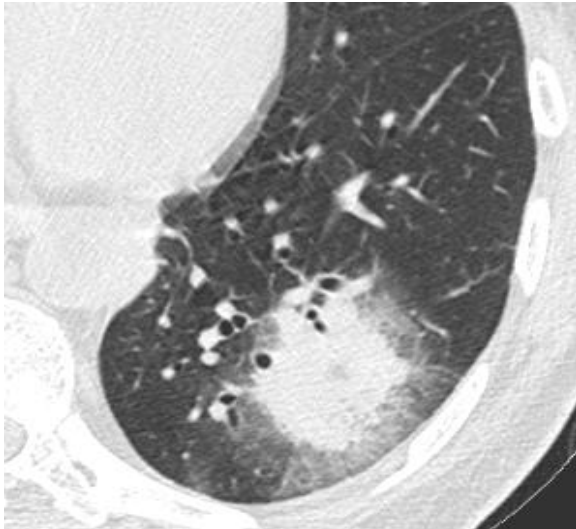


Neutropenia

PMN >> 500

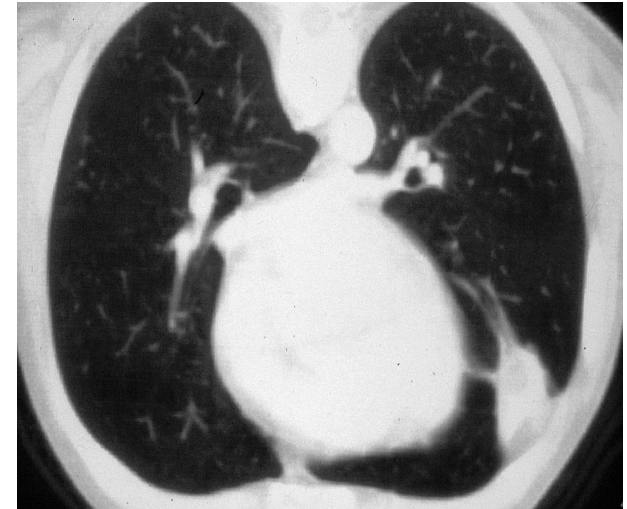
Πνευμονική μυκητιακή λοίμωξη

Mucor

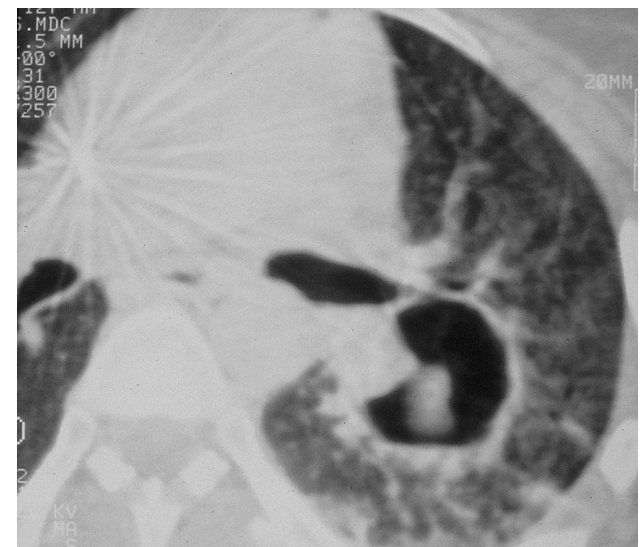
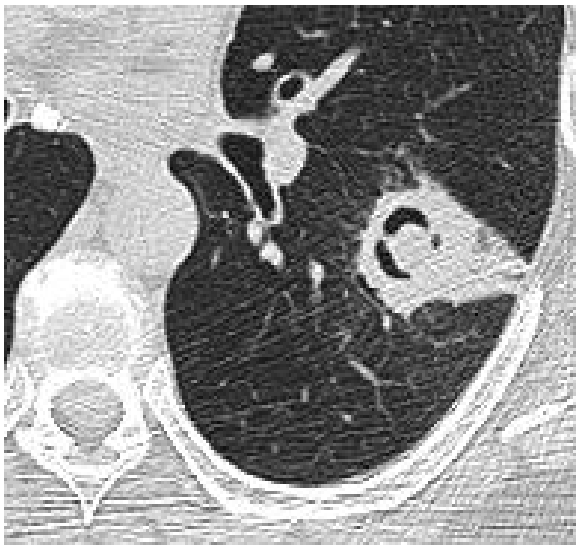


Halo-Sign

Aspergillus

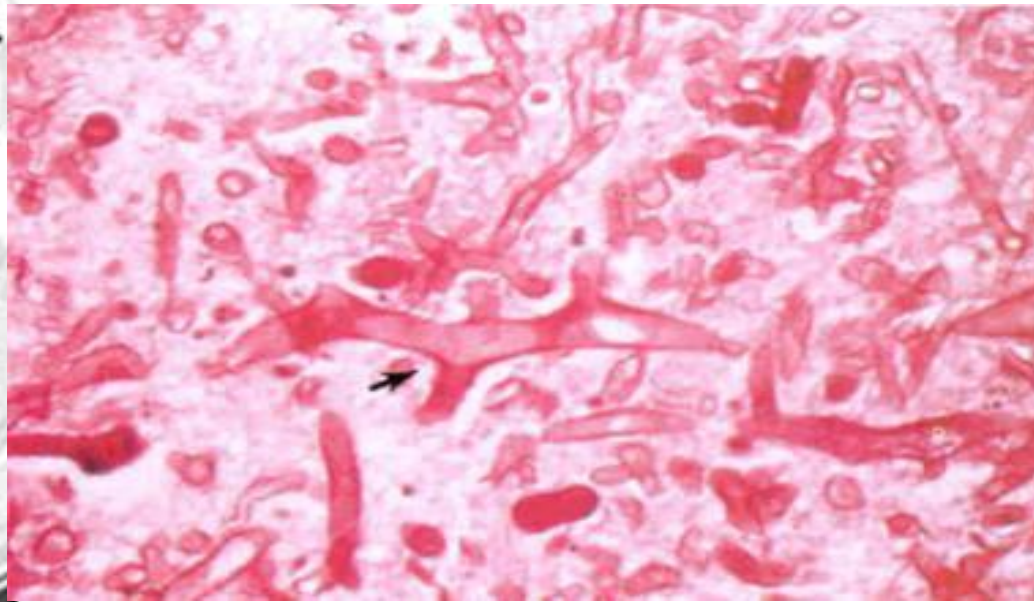


Air-Crescent-Sign

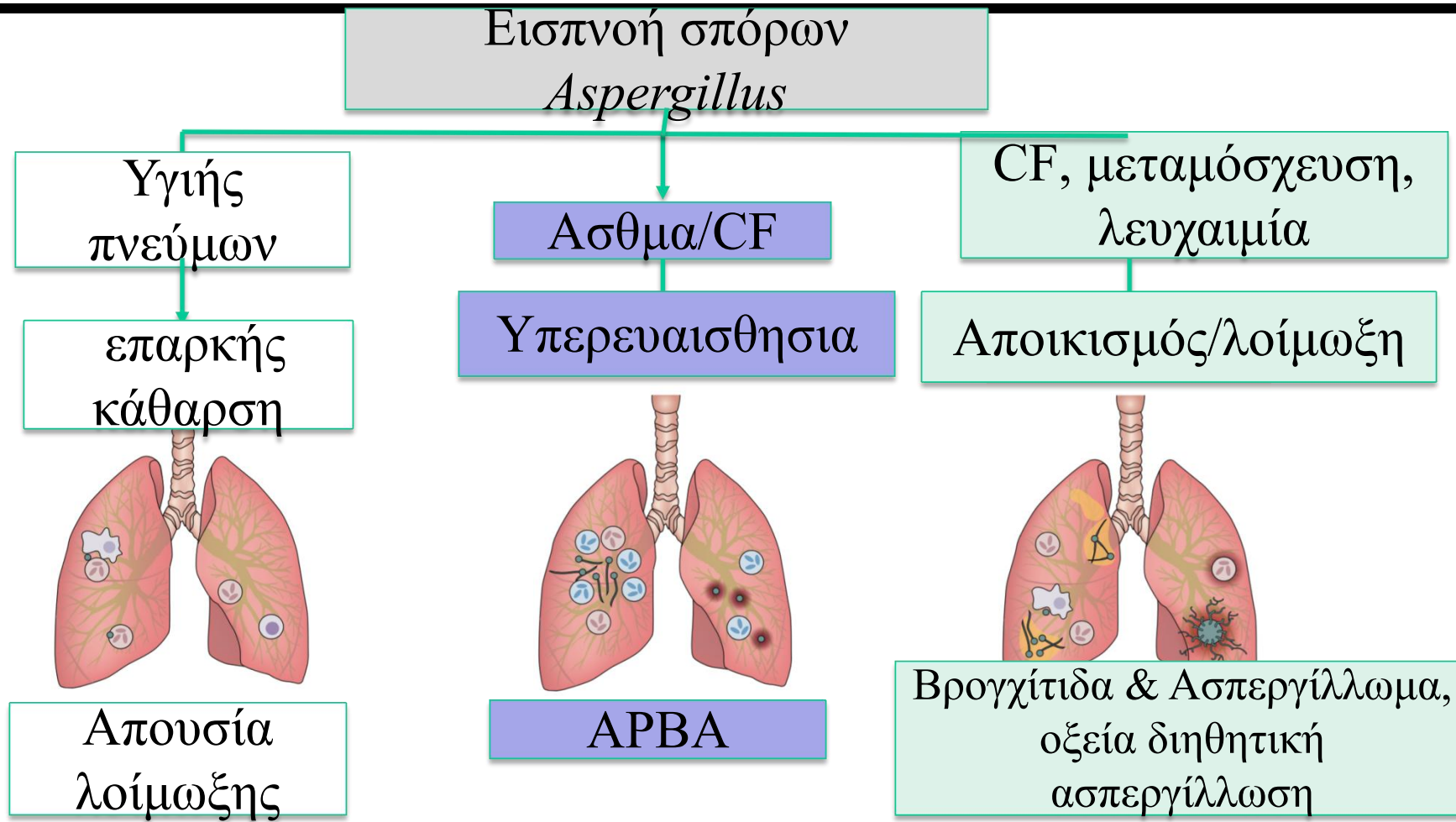


Mucor <4% των υφομυκητιάσεων σε
εμπύρετο ουδετεροπενία

A

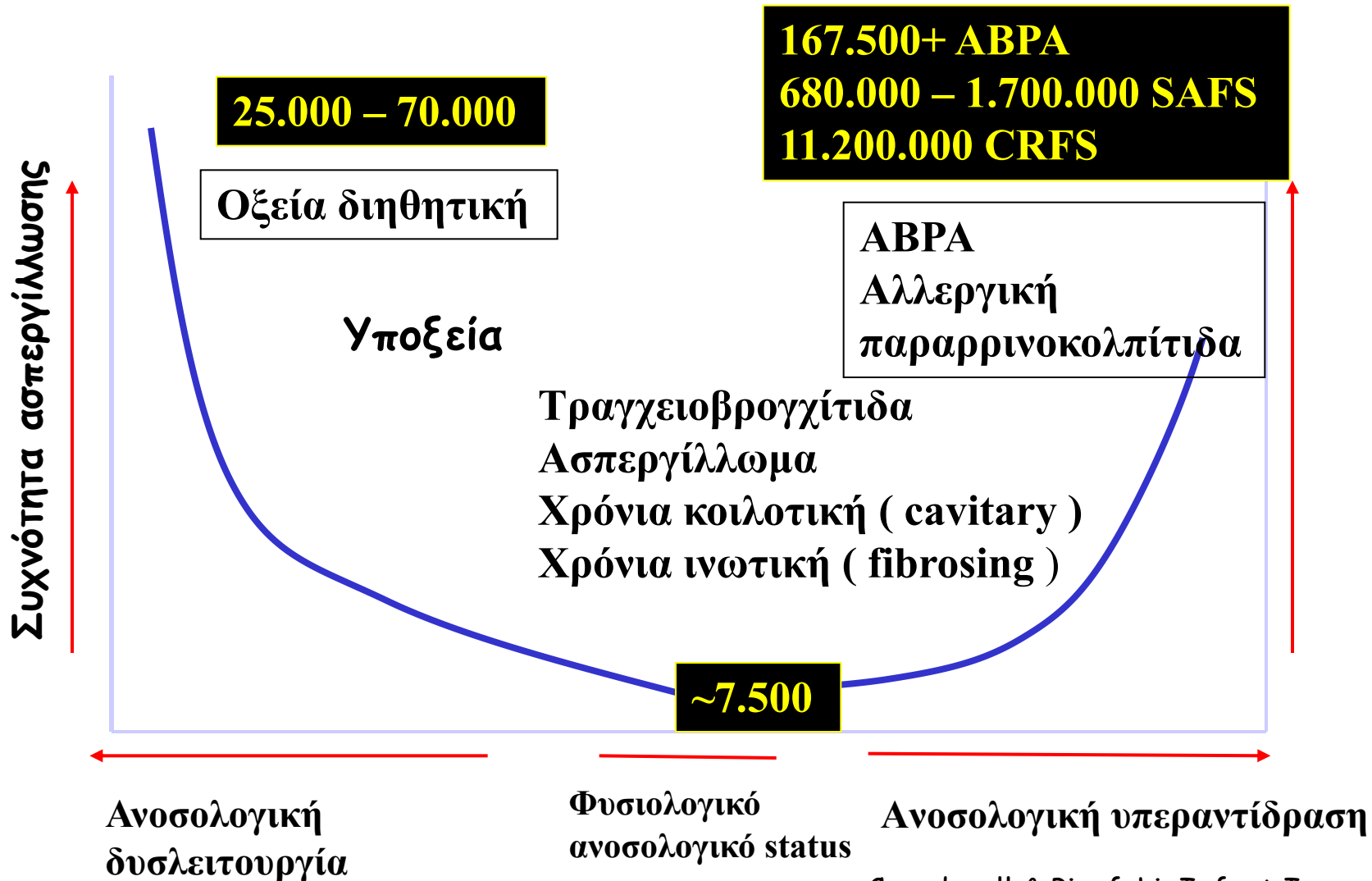


Ευρύ φάσμα εκδηλώσεων ασπέργιλλου

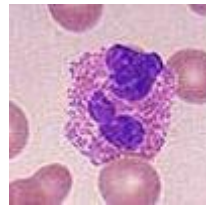
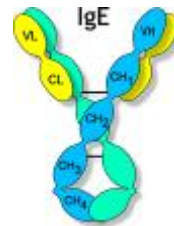
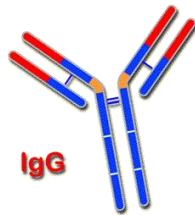
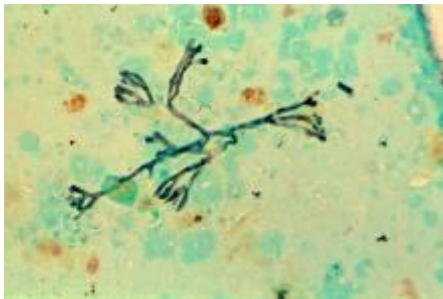


Adapted from: van de Veerdonk FL, et al. 2017. Nat Rev Microbiol.

Αλληλεπίδραση *Aspergillus* με ξενιστή επίπτωση σε Ευρώπη



Ασπεργίλλωση. Ποιος διαγνωστικός δείκτης σε κάθε μορφή ?



Invasive aspergillosis

Hematological patients

	Mycology Cytology	GM Ag	β -glucan	PCR (blood)	BAL (culture- Ag-PCR)	Imaging	Antibodies
Criteria for Δg	+	+			+	+	-
Markers to exclude infection			+	+			-

Non hematological patients

	Mycology Cytology	GM Ag	β -glucan	PCR (blood)	BAL (culture- Ag-PCR)	Imaging	Antibodies
Criteria for Δg	+	+/- (less sensitive)			+/- (less specific)	+	+/-
Markers to exclude infection			+	?	+		

Ποικίλη σημασία των διαγνωστικών τεστ στις διάφορες μορφές ασπεργίλλωσης

	Mycology, PCR, MS	Anti- Aspergillus antibodies	Aspergillus antigens	Allergic markers	Imaging
Chronic pulmonary aspergillosis	+	++	-	-	Radiography
Invasive aspergillosis	++	-	++	-	CT scan
Allergic aspergillosis	+/-	+	-	++	Radiography

Στρατηγικές συνδυασμού διαγνωστικών εργαλείων ανάλογα του ξενιστή και της νόσου

→ Σημαντική η πρόωπη διάγνωση και έναρξη κατάλληλης θεραπείας

Chronic cavitory pulmonary aspergillosis (CCPA)

45 year old man who smoked cigarettes showing an ill-defined shadow behind the clavicle



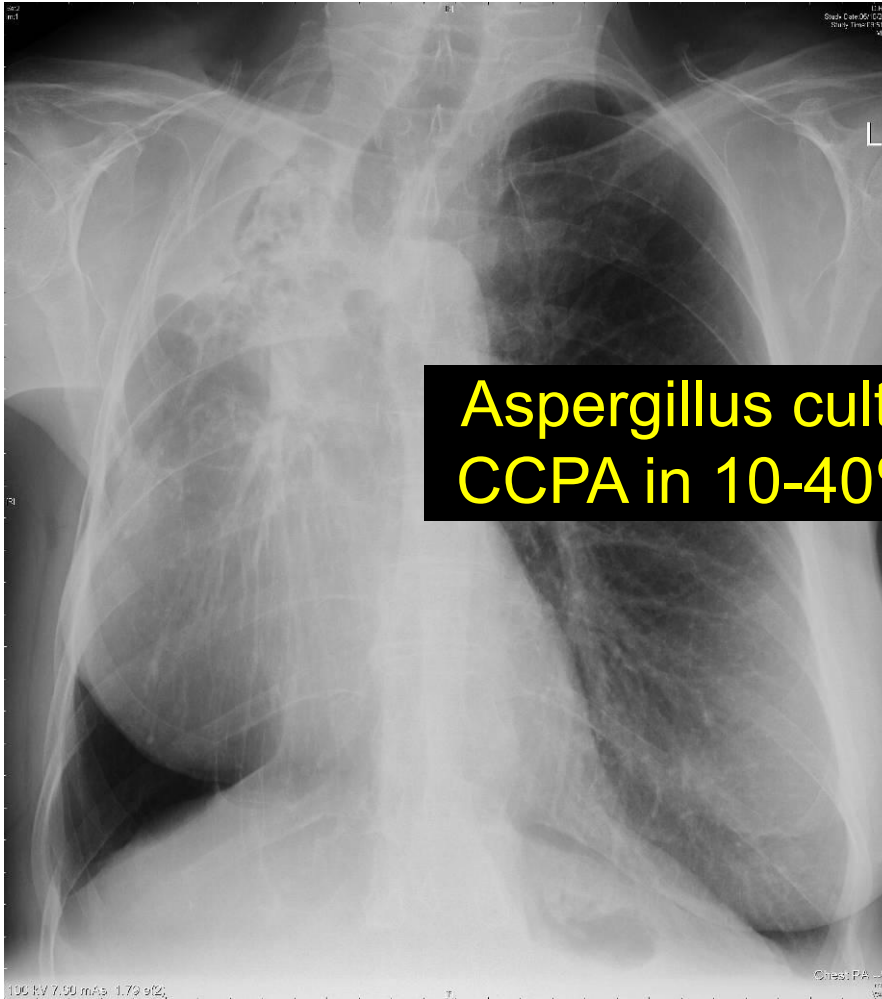
Patient RW
December 1991
Pre surgical resection



Patient RW
September 1992
Relapse in normal lung



Chronic cavitory pulmonary aspergillosis (CCPA) – sputum production



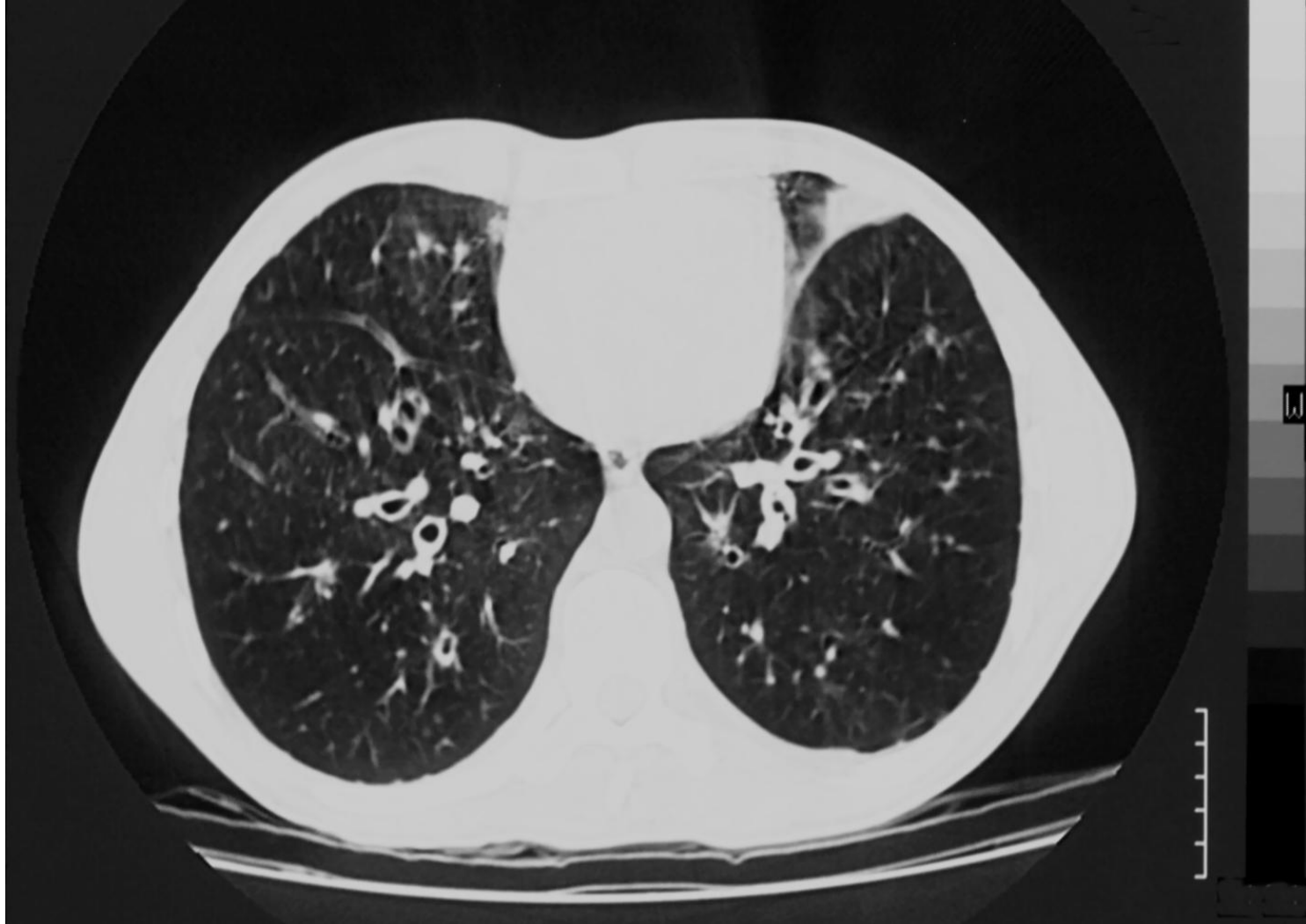
Aspergillus cultures positive in CCPA in 10-40% of cases only



Αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση (ABPA) – διαγνωστικά κριτήρια

- Άσθμα ABPA πιθανή
 - Ηωσινοφιλία ABPA πιθανή
 - Ιστορικό πνευμ. διηθημάτων ABPA πλέον πιθανή
 - Κεντρολοβιακές βρογχεκτασίες ABPA σχεδόν σίγουρη
-
- Precipitins against *A. fumigatus* positive
 - Aspergillus IgE antibody >2x asthma control
 - Aspergillus IgG antibody >2x asthma control
 - Total serum IgE concentration, >1000 iu/mL

ABPA - CT κεντρολοβιακές βρογχεκτασίες (central bronchiectasis)

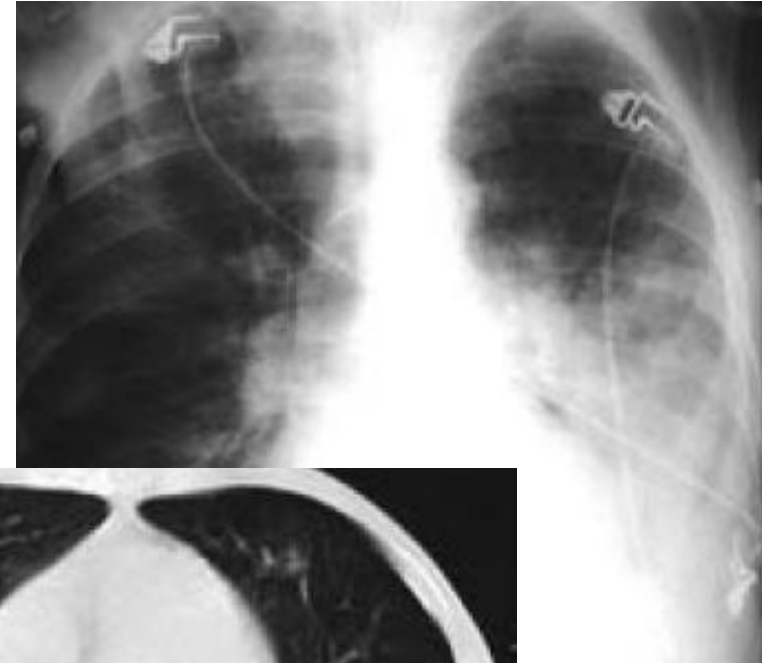
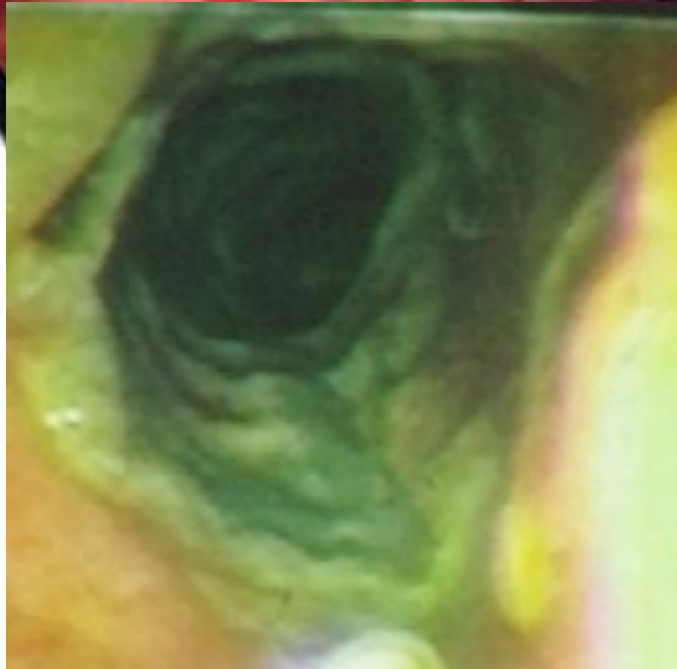
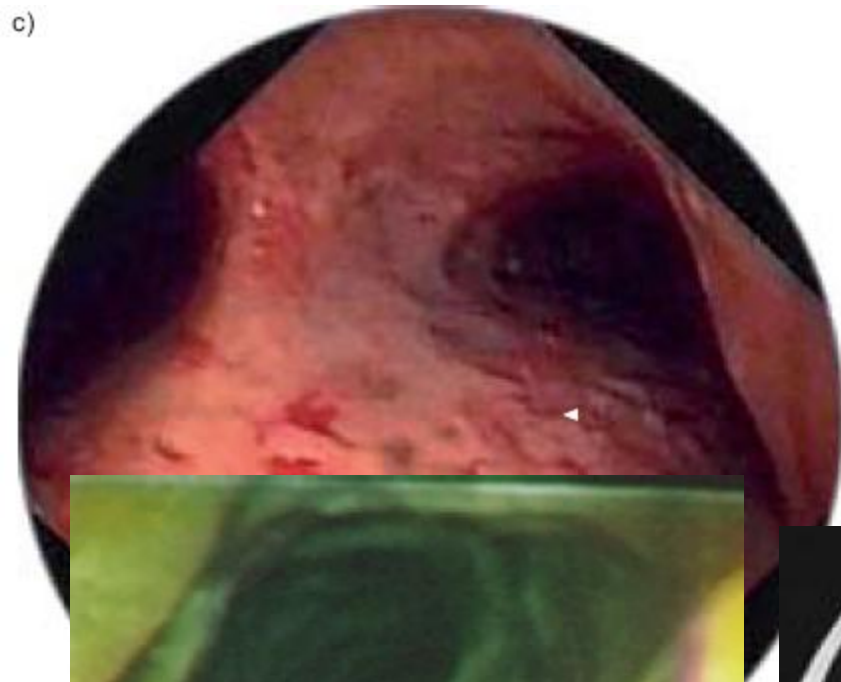


ΑΒΡΑ και σοβαρού βαθμού άσθμα



Pseudomembranous *Aspergillus* tracheobronchitis with IPA in COPD

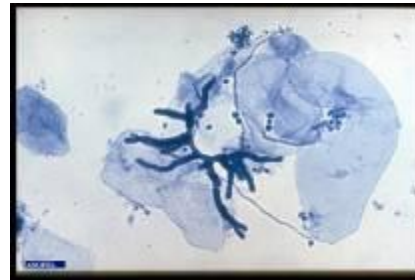
c)



Aspergillus - Διαθέσιμα διαγνωστικά εργαλεία και περιορισμοί

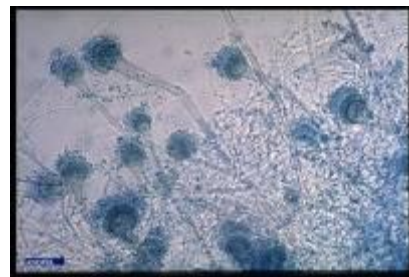
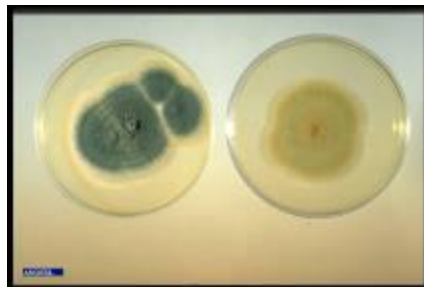
1. Κλασσικές μέθοδοι, ιστολογική:

Άμεση μικροσκόπηση



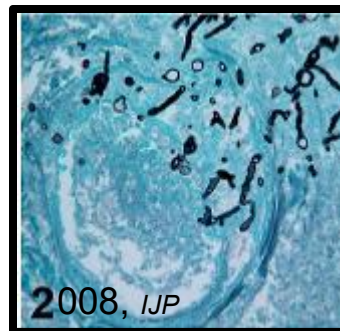
- χρονοβόρα
- Απαιτείται εμπειρία

καλλιέργεια



- Ποικίλη ευαισθησία
- θετικές καλ/γειες σε λοίμωξη ή αποικισμό

ιστολογική



- Δείχνει αγγειακή διήθηση
- δεν τυποποιεί είδος (*Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Scedosporium sp.*)

Aspergillus - Διαθέσιμα διαγνωστικά εργαλεία και περιορισμοί

2. Ορολογικές :

Ανίχνευση αντισωμάτων και αντιγόνων (Galactomannan και b1-3-D-glucan)

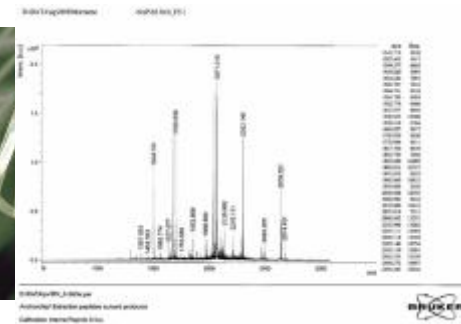
- ποικίλη ευαισθησία σύμφωνα με το ανοσολογικό status του ασθενούς
- ψευδώς θετικά

3. PCR και mass spectrometry:

- Απαιτείται standardization
- Όλο και χαμηλότερο κόστος

4. Δείκτες αλλεργίας : ηωσινόφιλα, PMN, total IgE, specific IgE

- ειδικότητα?

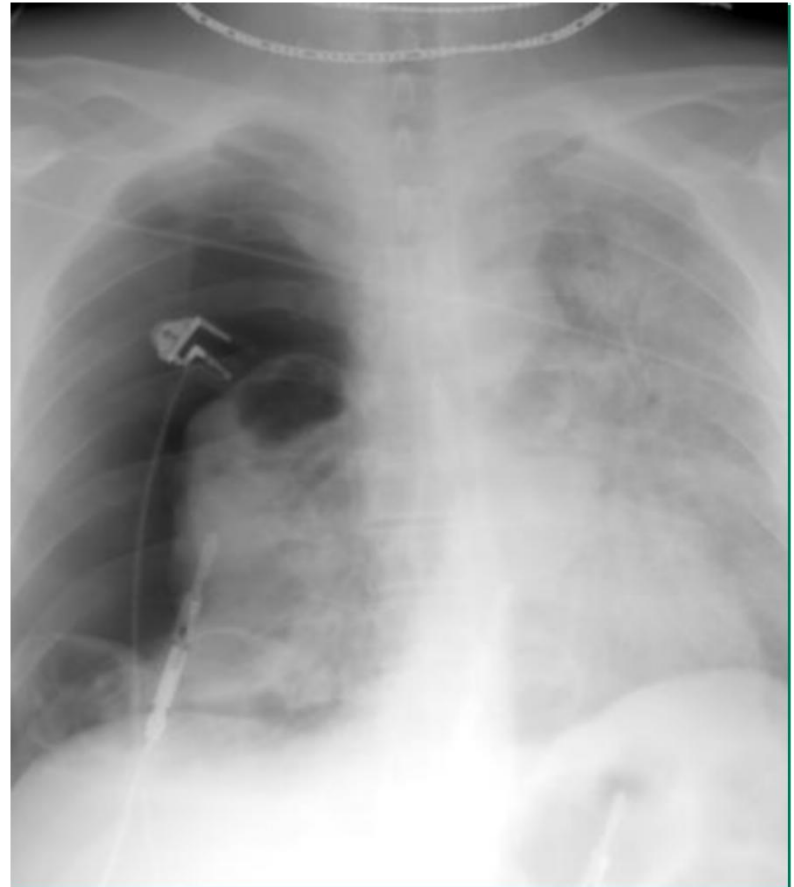


P. jirovecii

a)

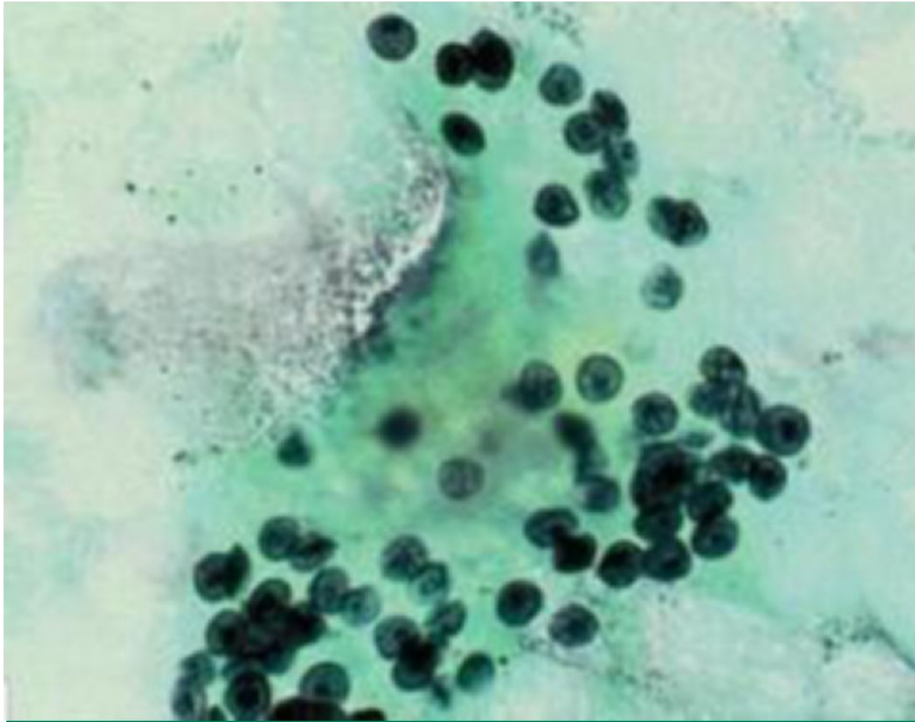


b)

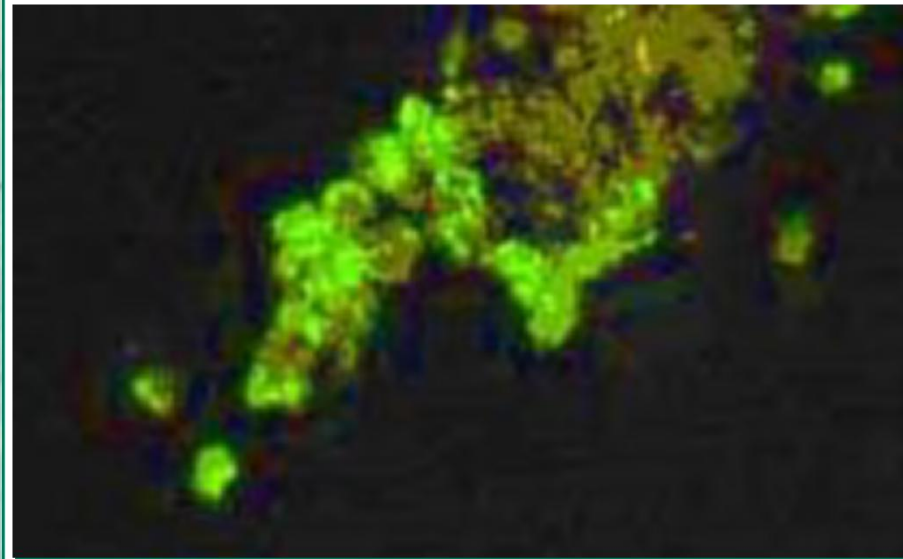


a) Αμφοτερόπλευρα διηθήματα με ground glass σε PCP b) Ατυπη εικόνα με πνευμοθώρακα ΔΕ σε PCP (Mu *et al.*, 2016).

Διάγνωση PCP με άμεση αναγώριση κυττάρων *Pneumocystis* με χρήση μικροσκοπίου



Χρώση Grocott's από *P. jirovecii* σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα από HIV ασθενή με εικόνα συμβατή με PCP (<http://medicine.academic.ru/140233>).



Ανοσοφθορισμός για ανίχνευση *Pneumocystis jirovecii* σε BAL (Weinstein., 2014).

PCP και (1-3)-β-D-glucan

- Αν και η (1-3)-β-D-glucan δεν είναι ειδική για PCP, αλλά το επίπεδο της (1-3)-β-D-glucan που ανιχνεύεται σε λοίμωξη από PCP μπορεί να υπερβεί $>500\text{pg/mL}$, ακόμα και σε αρνητική μικροσκοπική για IF. Αυτές οι υψηλές συγκεντρώσεις είναι χαρακτηριστικές σε PCP (*Koga et al., 2011; Damiani et al., 2013*).
- Μελέτες έχουν καταδείξει ότι αρνητική (1-3)-β-D-glucan μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αποκλεισμό διάγνωσης PCP με NPV $> 99\%$ καθώς υπάρχει αυξημένη ευαισθησία (*Onishi et al., 2012; Karageorgopoulos et al., 2013*).
- Η (1-3)-β-D-glucan έχει όριο (threshold) θετικότητας $>80\text{pg/mL}$.
- Λόγω μη ειδικότητας το θετικό τεστ για (1-3)-β-D-glucan θα πρέπει να ερμηνεύεται σε συνδυασμό με άλλη ειδική, όπως IF ή PCR και ακτινολογικά ευρήματα (*White et al., 2017*) για διάγνωση PCP

PCR για τη διάγνωση PCP

- Καθώς η *P. jirovecii* μπορεί να αποικίσει τους πνεύμονες, μπορεί να περιορίσει την αξία της PCR για τη διάγνωση της PCP (Davis et al., 2008).
- Στις δημοσιευμένες κατευθυντήριες οδηγίες της ECIL για τη διάγνωση PCP, 34 μελέτες με χρήση PCR testing, οδήγησαν στη υψηλότερη βαθμολόγηση σύστασης AII (AI σύσταση δεν ήταν εφικτή λόγω απουσίας τυχαιοποιημένων μελετών) για την χρήση της PCR στη διάγνωση PCP (Alanio et al, 2016).
- Αρνητική PCR έχει σύσταση AII για τη δυνατότητα αποκλεισμού PCP από δείγμα BAL (Alanio et al, 2016). Αυτό οφείλεται στην υψηλή αρνητική προγνωστική αξία και ευαισθησία της PCP PCR.



Image Courtesy of M. McGinnis
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

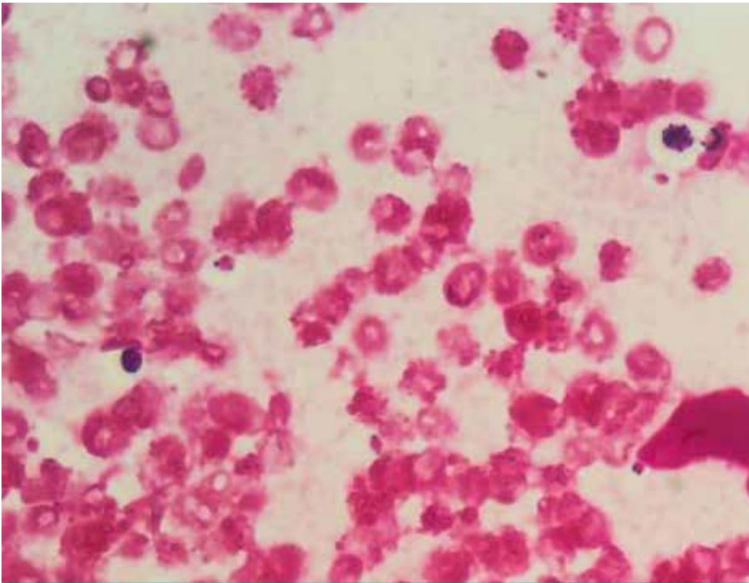


Cryptococcosis - καλλιέργειες

- Καλλιεργείται εύκολα σε standard υλικά με ανάπτυξη σε 2-10 ημέρες και μπορεί να απομονωθεί σε αιμ/γειες.
- Αν και η ποσοτική καλ/γεια σε ENY έχει εξαιρετη προγνωστική αξία για την αξιολόγηση της θεραπευτικής έκβασης σε μελέτες, δεν περιλαμβάνεται ακόμα στην κλινική πράξη.
- Η ανεύρεση encapsulated yeast σε ENY, βιοψία ιστού, αίμα ή ούρα θα πρέπει να αξιολογείται ακόμα και σε απουσία κλινικών συμπτωμάτων.
- Θετικές καλ/γειες πτυέλων θα πρέπει να αξιολογούνται ως λοίμωξη, αν και μπορεί να ανευρεθεί ο *Cryptococcus* στις εκκρίσεις ως σαπρόφυτο.
- **Όλοι οι ασθενείς με θετική μικροσκοπική για κρυπτόκοκκο, από οποιαδήποτε εστία θα πρέπει να διερευνώνται ως δυνητικά διάσπαρτη νόσος με καλλιέργεια και ανίχνευση αντιγόνου.**

C. neoformans

C. neoformans, σε Gram θετική χρώση από κηλίδα αίματος από θετική αιμ/γεια



Στρογγυλές εκβλαστήσεις (Round budding yeasts) χωρίς ψευδοϋφές. Ο *Cryptococcus* χρωματίζεται ως gram (+) και μπορεί εσφαλμένα να θεωρηθεί λεμφοκύτταρο. Χρώση με σινική μελάνη (India ink) ειδική για διάγνωση

C. neoformans, καλ/γεια SBA



Βλενώδεις αποικίες λόγω παρουσίας καψιδίου

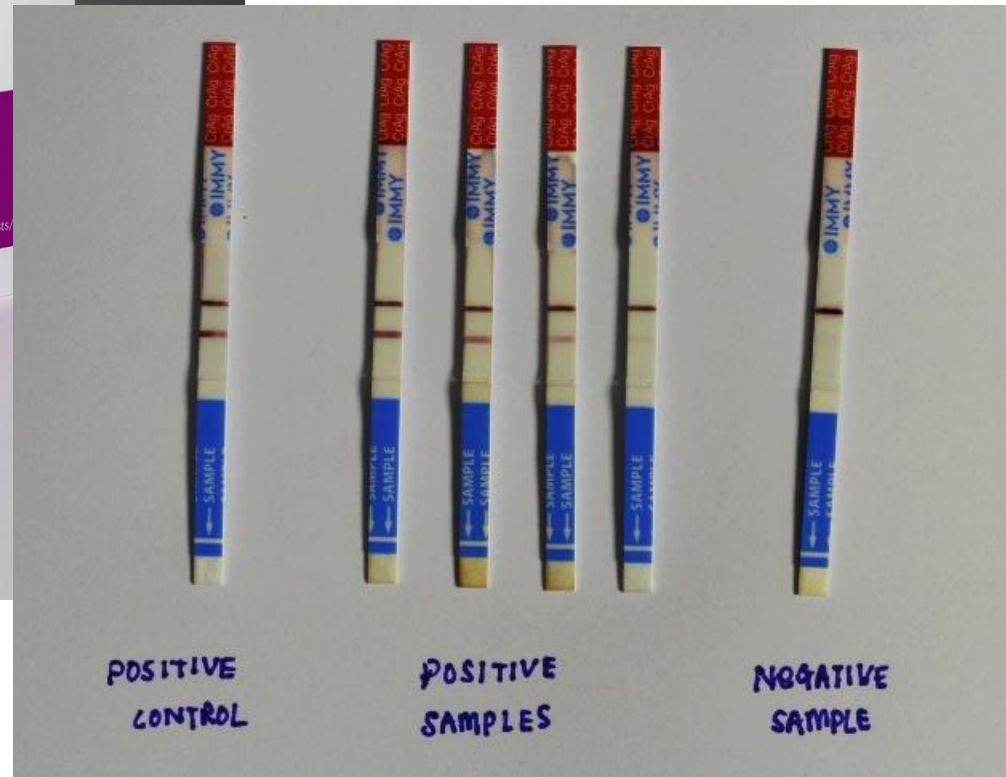


Τα περισσότερα στελέχη *Cryptococcus* είναι ουρεάση θετικά

Οι ορολογικές εξετάσεις σε λοιμώξεις από *cryptococcus Ag*

- Υπάρχει σχετική συσχέτιση μεταξύ φορτίου αντιγόνου και φορτίου μύκητα πριν την έναρξη θεραπείας, άρα **ο τίτλος του αντιγόνου δυνητικά έχει προγνωστική αξία.**
- Υπάρχουν 2 διαθέσιμα εμπορικά tests, latex agglutination και ELISA. **Η ευαισθησία και ειδικότητα αυτών των τεστ είναι > 90%** και, αν και περιστασιακά υπάρχουν ψευδώς θετικά και αρνητικά τεστ, μπορεί να διευκρινισθούν με προσεκτική επανάληψη ή και θετικές καλ/γυειες.
- Σε ενδημικές περιοχές για κρυπτόκοκκο, σε κάθε υποξεία ή χρόνια μηνιγγίτιδα θα πρέπει να διενεργείται έλεγχος ENY για πολυσακχαριδικό Ag κρυπτοκόκκου.
- Παρά τη διαγνωστική αξία του δεν είναι πολύ ακριβές για την παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης.

Ag Κρυπτοκόκκου - Lateral Flow Test



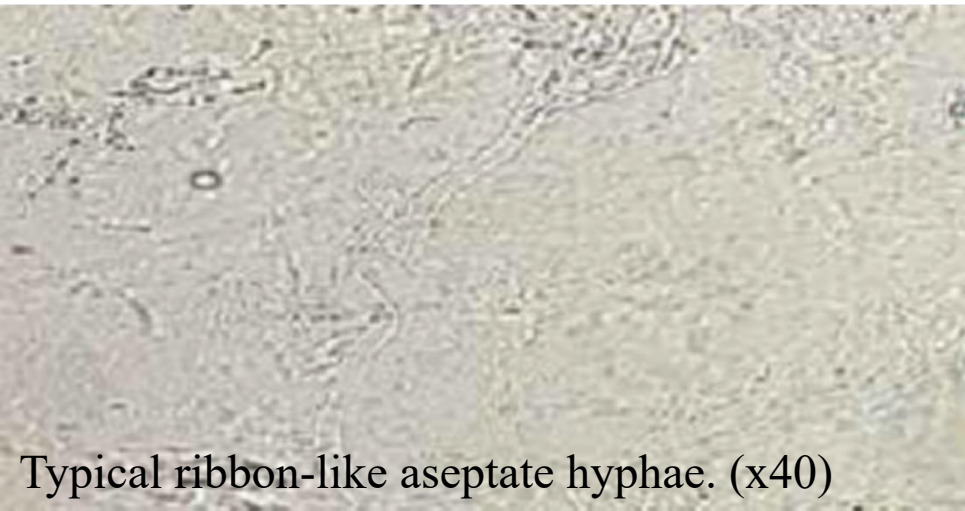
Mucormycosis



Mucorales, growth on tissue at room temperature.



Mucorales, microscopy on 10% KOH wet mount smear



Typical ribbon-like aseptate hyphae. (x40)

Περιστατικό Ι

- Άνδρας 62 ετών προσέρχεται στα ΤΕΠ λόγω πυρετού από τριημέρου, ως κύριο σύμπτωμα.
- Τις πρώτες ημέρες από την εισαγωγή του παρουσίασε δερματικές βλάβες , που βαθμιαία επιδεινώθηκαν.



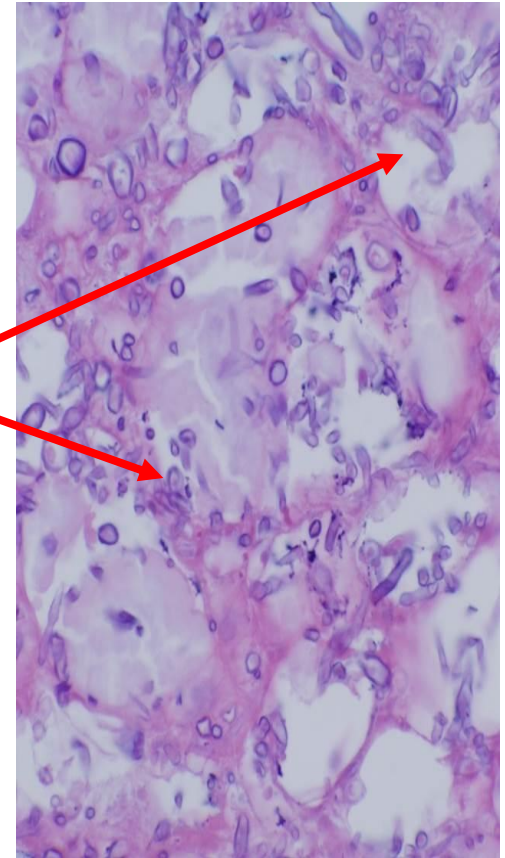
Ιστορικό ΟΜΛ για την οποία έχει λάβει ΧΘΠ και έχει υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση.

Μικροβιολογικό Work-Up

- Υλικά εστάλησαν για καλ/γειες για απομόνωση μικροβίων ή και μυκήτων, τα οποία ευθύνονται για την συμπτωματολογία του ασθενούς.
 - Καλ/γειες αίματος για συστηματική, διάσπαρτη λοίμωξη.
 - Ιστός από βιοψία δέρματος εστάλη για απομόνωση μύκητα, μετά την ανάδειξη σε άμεση μικροσκοπηση από τη βλάβη.
- Επίσης εστάλησαν PCR, αντιγόνα, αντισώματα έναντι ιών και μυκήτων.

Βιοψία δέρματος

- Το αποτέλεσμα της βιοψίας δέρματος ανέδειξε υφές μυκήτων με διήθηση αιμοφόρων αγγείων
- Οι υφές περιγράφονται ως **διχοτομούμενες (septated)** με οξεία διακλάδωση (acute angle-branching), με χαρακτηριστικά συμβατά με *Aspergillus*.



Αποτελέσματα μικροβιολογικού εργαστηρίου

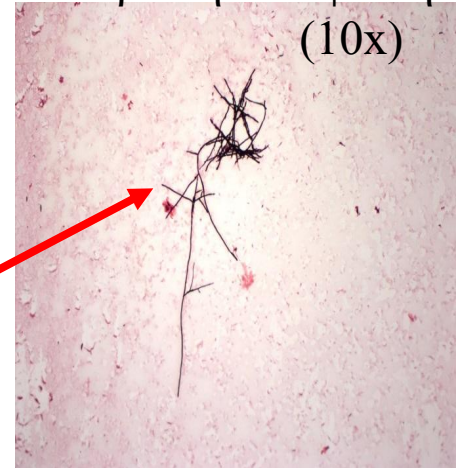
10 όλες οι καλ/γείες αρνητικές για μικρόβια...

10 ΑΛΛΑ ένας μύκητας ανεπτύχθη σε φιάλη αιμ/γείας και ήταν ορατός και σε Gram χρώση.

10 Ο ίδιος μύκητας αναπτύχθηκε επίσης σε καλ/γεία ιστού.

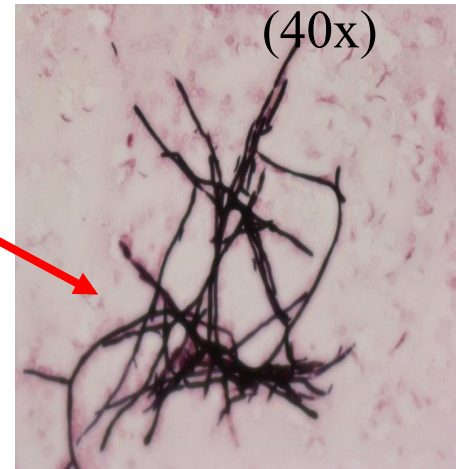
Χρώση από φιάλη αιμ/γείας

(10x)



Χρώση από καλ/γεία ιστού

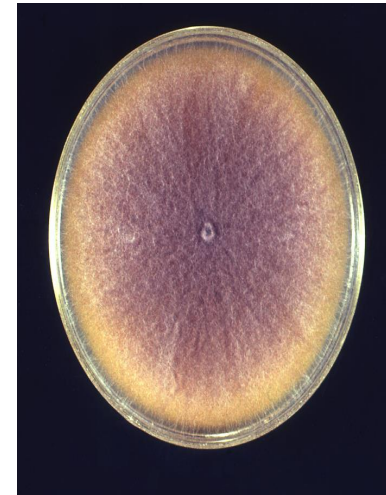
(40x)



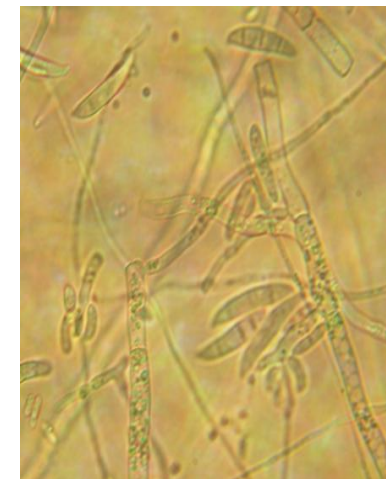
Μυκητολογικές εξετάσεις

- 10 Μορφολογία αποικιών, δομή μυκήτων μικροσκοπικά και σε καλ/γεια.
- Οι μικροβιολόγοι θα πρέπει να έχουν μεγάλη εμπειρία και κλινικές πληροφορίες.

- 10 Με βάση τη φαινοτυπική ανάλυση, ο μύκητας ταυτοποιήθηκε ως *Fusarium* sp.



Μορφολογία αποικιών

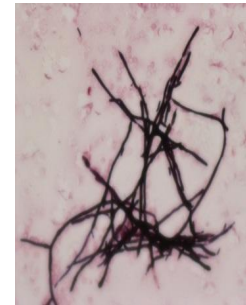


Δομή σε μικροσκόπηση

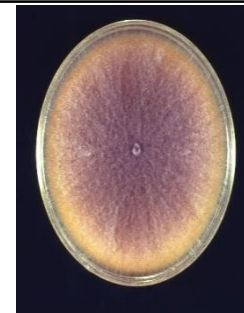
Διάγνωση : Fusariosis

- Οι λοιμώξεις από *Fusarium* ή φουζαρίωση (fusariosis), μπορεί να αφορούν επιφανειακή, τοπικά διηθητική ή διάσπαρτη νόσο.
- Λόγω της παρουσίας στο περιβάλλον, όμως, η απομόνωση *Fusarium* sp σε καλ/γείες μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση από το περιβάλλον.
- Η συνεργασία μικροβιολόγου και κλινικού θα πρέπει να είναι στενή για αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.
- Clues για την κλινική σημασία είναι:
 - ☑ Παρουσία μυκήτων σε άμεση χρώση ιστού
 - ☑ Εστία απομόνωσης και ξενιστής
 - ☑ Ίδιος μύκητας από πολλαπλές εστίες
 - ☑ Πολλαπλές αποικίες από το ίδιο υλικό

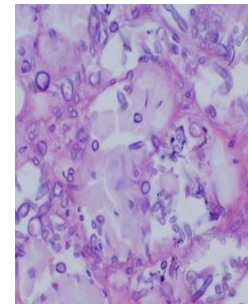
Από αίμα



Πολλαπλά υλικά

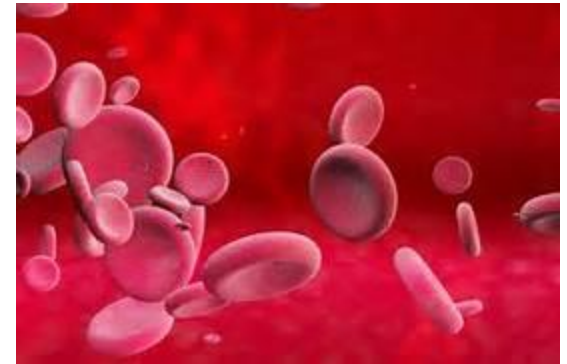


Από ιστό



Περιστατικό II

- Ασθενής 42 ετών με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (M3) υποβάλλεται στον 1^ο ΧΘΠ κύκλο βάσει πρωτοκόλλου (Vesanoid (ATRA) Zavedos (Idarubicin) Aracytin, Novantrone, Vepesid).
- Ο έλεγχος καρυότυπου του μυελού δεν ανέδειξε χρωμοσωμιακές ανωμαλίες ενώ ήταν αρνητικός και ο μοριακός έλεγχος αίματος για προϊόντα υβριδικού γονιδίου PML/RAR α





Στην ασθενή με εμπύρετη ουδετεροπενία υπό ευρέως φάσματος AMB από 10ημέρου αποφασίζεται έναρξη εμπειρικής θεραπείας με Ambisome

CT στην έναρξη του Ambisome



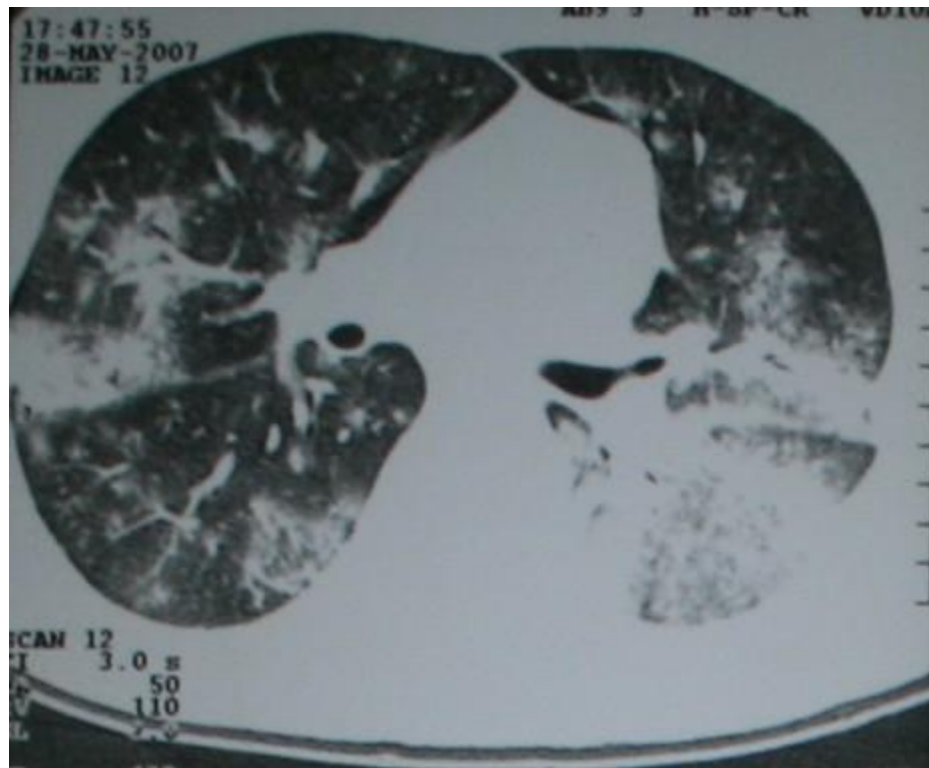
Όταν η ανασφάλεια και ο φόβος κυριαρχούν....



**Ο ασθενής συνεχίζει να πυρέσσει, WBC
200. αιμ/γειες αρνητικές.**

**Νέα διηθήματα στην ακτινογραφία
θώρακος
τι θα κάνετε?**

Επιδείνωση CT 1 εβδομάδα από την έναρξη Ambisome . Ο ασθενής χωρίς άλλα κλινικά ευρήματα, πλην πυρετού



Ε.Για τεκμηρίωση διάγνωσης, τι έλεγχο θα διενεργούσατε?

1. Έλεγχος επιπέδων αντιγόνου GM
2. CT θώρακος
3. Έλεγχος για β -D-glucan
4. Έλεγχος με PCR ορού
5. Βρογχοσκόπηση, καλ/γεια και μέτρηση GM
απο BAL
6. Το 1, 2 και 5
7. Το 1 και 2
- 8 Το 1,2 και 4

Ισχυρή συσχέτιση επιπέδων GM και έκβασης ασπεργίλλωσης σε αιματολογικούς ασθενείς

- Ανασκόπηση 27 μελετών, 257 ασθενείς υπο ΧΘΠ και HSCT με τεκμηριωμένη/πιθανή IA
- Συσχέτιση GM και έκβασης IA
- Μείωση GM σχετίζεται με ανταπόκριση, ενώ εμμένουσες τιμές ή αύξηση είναι ενδεικτικές εξέλιξης IA

Miceli MH, et al. Clin Infect Dis 2008

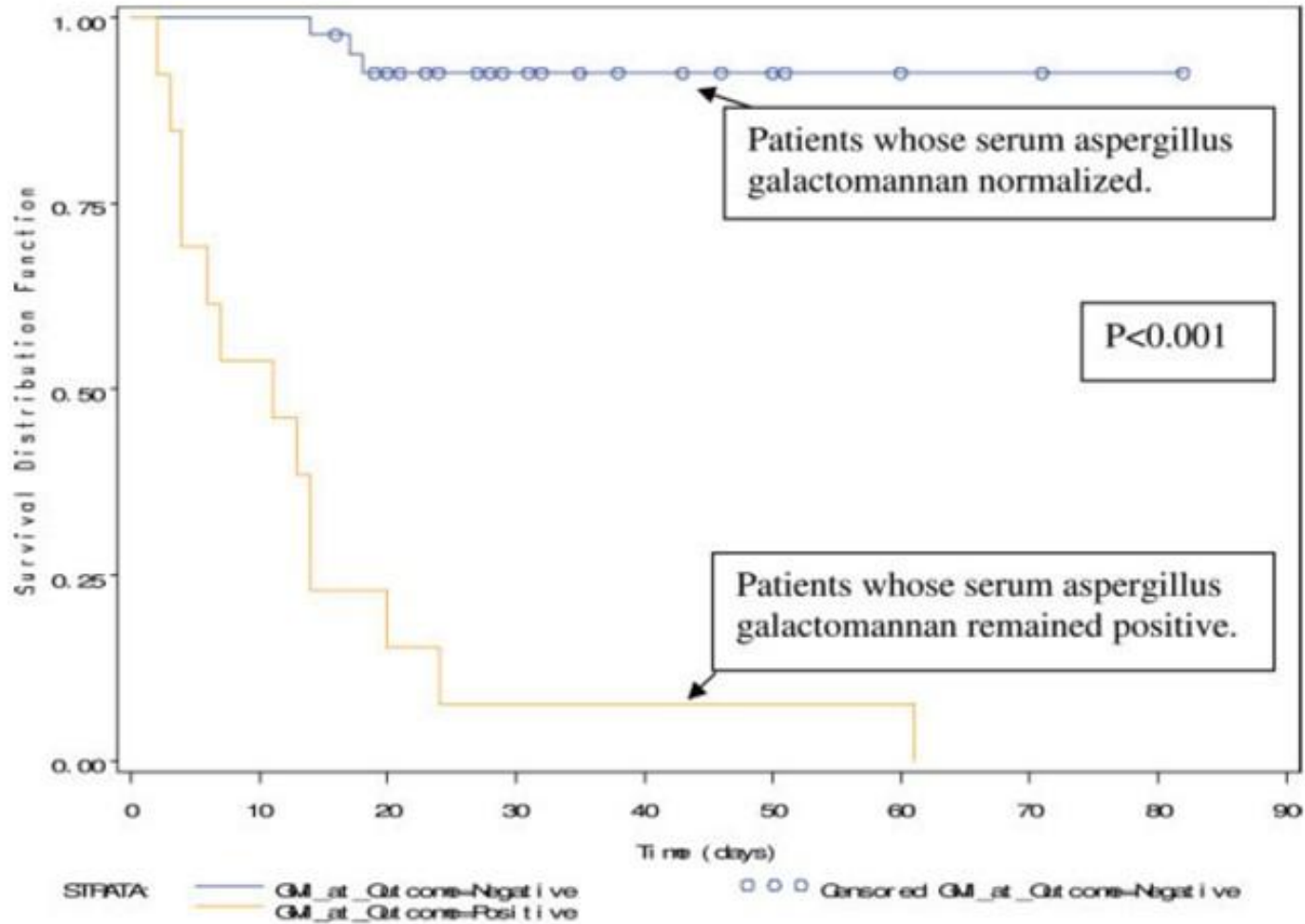
Διαδοχικές μετρήσεις αντιγοναιμίας GM

- Τα επίπεδα GM ορού σχετίζονται με την έκβαση IA
- 56 ενήλικες με αιματολογική κακοήθεια (90% μυέλωμα) 2 διαδοχικές μετρήσεις GMI ορού > 0.5 .
- Η επιβίωση παρουσίαζε ισχυρή συσχέτιση με τα επίπεδα της GM

Woods G, Cancer 2007;110(4):830-4

Επίπεδα GM και επιβίωση

Woods et al Cancer 2007

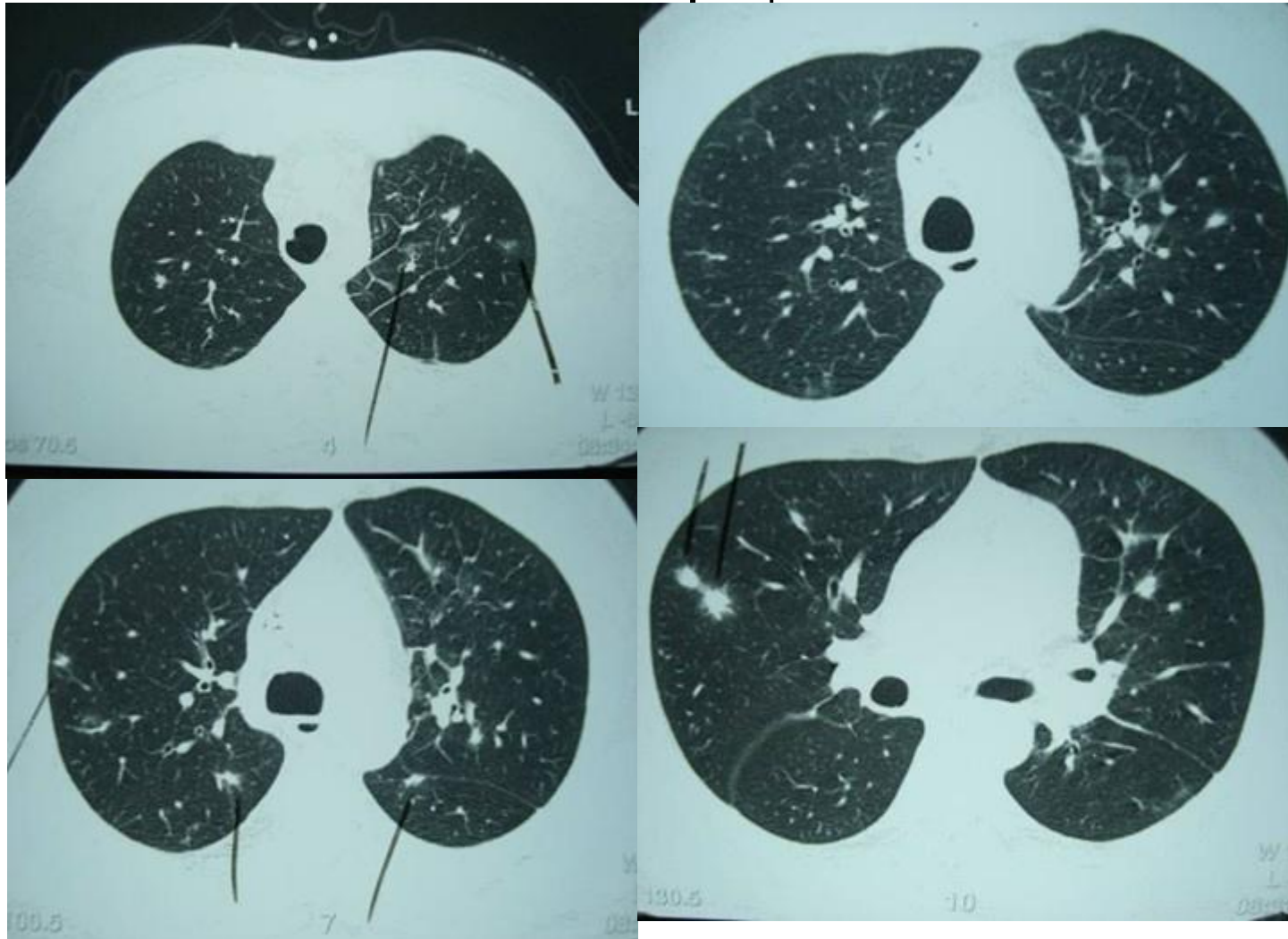


περιστατικό συνέχεια....

Στον ασθενή γίνεται μέτρηση Ag GM (2.5) αλλαγή του Ambisome σε βορικοναζόλη.



Ο ασθενής υπό βορικοναζόλη παρουσιάζει
πλευρωδυνία, αιμόπτυση, δύσπνοια
Ουδετερόφιλα 600



Περιστατικό. Συνέχεια....

Τι κάνουμε ?

- Μέτρηση επιπέδων βορικοναζόλης?
- BAL ?
- Πιθανή μουκορμύκωση ?
- Αλλαγή αντιμυκητιασικής αγωγής?

- Σε νέο δείγμα για GM ορού: 1.0
- Συνέχιση βορικοναζόλης

Αν ...

Ασθενής παρουσιάσει παροδική κλινική και ακτινολογική επιδείνωση....

- Η μέτρηση GM μπορεί να είναι υποβοηθητική
- Σε ↓ επιπέδων GM σε φυσιολογικά επίπεδα: υποψία για IRIS
- Συνέχιση ίδιου αντιμυκητιακού . Θεώρηση για προσθήκη στεροειδούς

“IRIS” σε ασπεργίλλωση

- **Θανατηφόρος αιμόπτυση μετά GM-CSF¹**
- **8/20 ουδετεροπενικοί ασθενείς με IA σοβαρές πνευμονικές επιπλοκές (5/8 απεβίωσαν)²**
- **19/67 (28%) ασθενών με αιματολογική κακοήθεια ή HSCT και IA ανέπτυξαν επιδεινούμενη υποξαιμία, δύσπνοια, εξελισσόμενα διηθήματα 8-15 ημέρες μετά την λύση της ουδετεροπενίας³**
 - 2 έλαβαν κορτιζόνη
 - όλοι είχαν χαμηλούς τίτλους GM

1. Groll AH, et al. Mycoses 1992;35:67-75

2. Todeschini G, et al. Eur J Clin Invest 1999;29(5):453-7

3. Miceli MH, et al Cancer 2007;110(1):112-20

'PIRIS'

Pulmonary Immune Reconstitution Inflammatory Syndrom

Caspofungin

70/50



- Neutrophils: 0/ μ L
- Neutrophils: 12.360 / μ L

GM serum: 3.2

GM serum: 0.8

GM BAL: 8.6

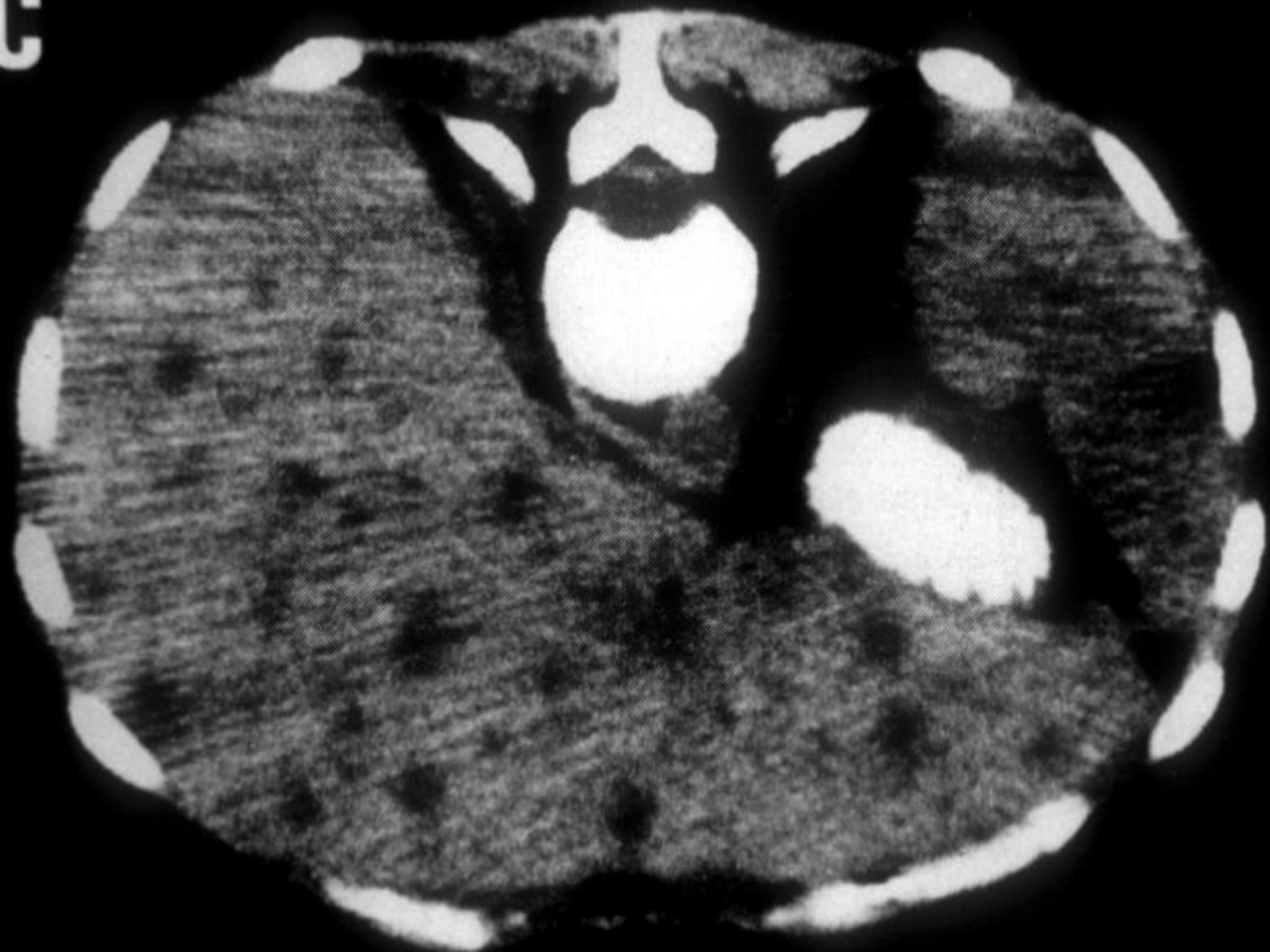
GM BAL: 1.2

Περιστατικό III

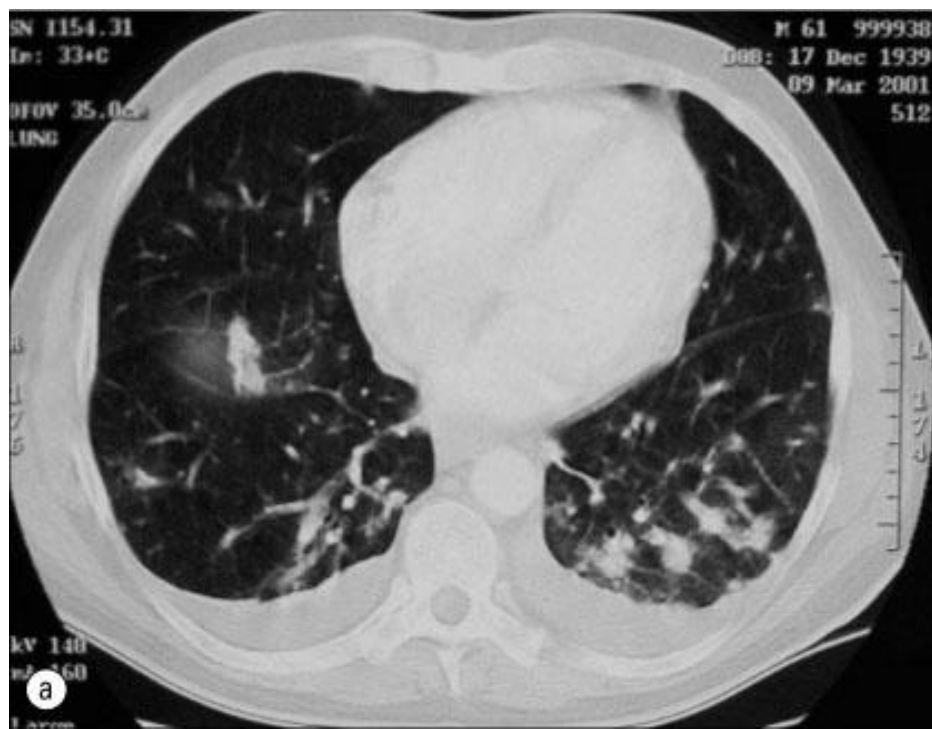
Γυναίκα με Οξεία λευχαιμία, 56 ετών, με παρατεταμένη περίοδο ουδετεροπενίας, μετά το 5ο ΧΘΠ σχήμα, δεν απυρετεί με εμπειρική αντιμικροβιακή αγωγή.

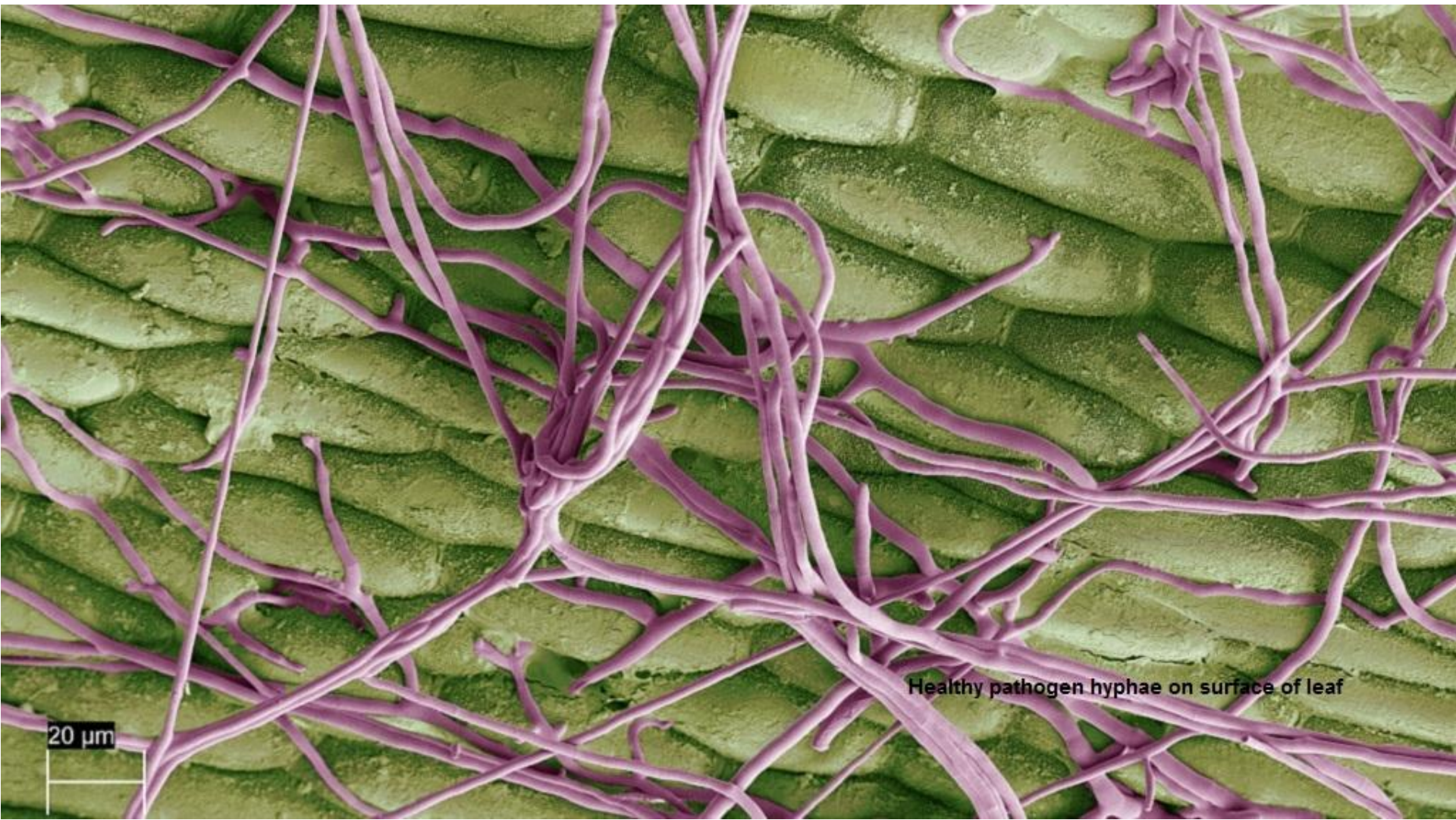
Στη φάση ανόδου των ουδετεροφίλων εμμονή του εμπυρέτου με συνοδό κακουχία, κοιλιακό άλγος, ηπατοσπληνομεγαλία αύξηση ALP
(Φυσιολογικός ο λοιπός βιοχημικός έλεγχος)

Τι σκέφτεστε?

C

ηπατοσπληνική καντιντίαση (IRIS syndrome?)





Healthy pathogen hyphae on surface of leaf

20 μm